

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apotheker Marc Thöle
aus Hameln

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2000

ARZNEISTOFFTRANSPORT AN DER

BLUT-HIRN SCHRANKE:

DRUG TARGETING MIT

LIPOSOMALEN KONJUGATEN

Gutachter:

Prof. Dr. Gert Fricker

Prof. Dr. Helga Möller

für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Fricker danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stete Ansprechbarkeit, für die wertvollen Anregungen und für das Gewähren von ausreichendem wissenschaftlichen Freiraum zum selbständigen Arbeiten.

Frau Prof. Dr. Möller danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens.

Frau Dr. Dillmann-Marschner danke ich besonders für ihre stete Ansprechbarkeit und Hilfe bei Fragen und Problemen.

Darüber hinaus danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Dr. Jörg Huwyler (Hoffmann-La Roche, Basel), Herrn Dr. Jürgen Drewe, Frau Heike Gutmann, Frau Ursula Behrens und Herrn Dr. Michael Török (Kantonsspital, Basel) für die Einarbeitung in die Methoden der Zellisolierung und Zellkultivierung;
- Herrn Dr. David S. Miller (NIEHS, Research Triangle Park) für Anregungen und Diskussionen zu den Gebieten Endozytose und konfokale Mikroskopie;
- den Herren Dr. Martin Picard und Dr. Rainer Uhrig (DKFZ, Heidelberg) für die Zusammenarbeit bei den Experimenten mit Salicylsäure-Glucosid;
- Frau Ana Ballester (Universität Santiago de Compostela) und Herrn Björn Bauer für die Zusammenarbeit bei der Zellisolierung und Zellkultivierung, darüber hinaus Björn für die Unterstützung bei der Auseinandersetzung mit „femininer Logik“;
- Frau Stephanie Nobmann für das Überlassen von isolierten Gehirn-Kapillaren und für ihre zahlreichen Fragen zu essentiellen Aspekten der modernen Gesellschaft;
- Herrn Dr. Günter van Almsick für die nette Atmosphäre im Labor und die intensiven (fachlichen) Diskussionen bei gutem Essen und gutem Wein;
- Frau Susanne „Sumi“ Michael für ihre beeindruckende Geschwindigkeit am Buffet des „gala evenings“;
- Herrn Dr. Martin „Windows 3.11“ Bultmann für die gemeinsamen Besuche von Modellbahn-Börsen und -Messen;
- Herrn Dr. Frank Lintz für die Diskussionen beim abendlichen Bier;
- Herrn Dr. „Sir“ Tilman C. Rock und Ehefrau Beate für die Einführung in das Heidelberger Nachtleben;
- Herrn Christoph Groebel für das Verlängern der Mittagspause durch seine Essgeschwindigkeit;
- Herrn Dr. Christopher Lucas für seine Gesangseinlagen bei mehreren blasenträchtigen Wanderungen;
- Herrn Dr. Christian Schreck und Frau Elke Sternberger für die unterhaltsame gemeinsame Betreuung von Praktika;
- Herrn Jörg Linder für die Einführung in das Karlsruher ÖPNV-System;
- allen übrigen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern am Institut, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin Jutta Deselaers.

Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen oder veröffentlicht:

M. Thöle, G. Fricker, M. Török, J. Drewe

„Entwicklung eines *in vitro* Blut-Hirn Schranke-Modells aus Kapillar-Endothelzellen des Schweins zur Untersuchung der Arzneistoff-Passage ins Gehirn“

Doktorandentagung der DPhG, Würzburg 1997

M. Thöle, S. Nobmann, B. Bauer, J. Huwyler, G. Fricker

„Drug delivery across brain endothelium by liposomal conjugates“

Jahrestagung der AAPS, San Francisco 1998

PharmSci Supplement, 1 (1), 1998, 379

M. Thöle, S. Nobmann, B. Bauer, J. Huwyler, G. Fricker

„Drug delivery across cerebral capillary endothelial cells by liposomal conjugates“

Jahrestagung des CRS German Local Chapter, Erlangen 1999

M. Thöle, G. Fricker

„Entry of cationized albumin-coupled liposomes into brain endothelium“

Jahrestagung der APV, Berlin 2000

Weitere Veröffentlichungen:

J. Huwyler, J. Drewe, H. Gutmann, M. Thöle, G. Fricker

„Modulation of morphine-6-glucuronide penetration into the brain by P-glycoprotein“

Jahrestagung der European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Berlin 1997

International Journal of Clinical Pharmacology, 36 (2), 1998, 69-70

M. Török, M. Thöle, J. Huwyler, H. Gutmann, J. Drewe, G. Fricker

„Transport of clonidine across the blood-brain barrier *in vitro*“

Jahrestagung der APV, Paris 1998

S. Michael, M. Thöle, R. Dillmann, A. Fahr, J. Drewe, G. Fricker

„Improvement of intestinal peptide absorption by a synthetic bile acid derivative, cholylsarcosine“

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2), 2000, 133-140

1	Einleitung	1
1.1	Barrieren des Arzneistofftransports zum Gehirn	1
1.1.1	Vergleich von Blut-Hirn Schranke und Blut-Liquor Schranke	2
1.1.2	Zelluläre Umgebung der Blut-Hirn Schranke	3
1.1.3	Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke	4
1.1.3.1	Passive Diffusion	5
1.1.3.2	Transport durch Carrierproteine	5
1.1.3.3	Exportproteine.....	5
1.1.3.4	Zytotische Prozesse.....	6
1.1.3.4.1	Rezeptorvermittelte Endozytose	6
1.1.3.4.2	Nicht-rezeptorvermittelte Endozytose	6
1.1.3.4.3	<i>Coated pits</i> und <i>caveolae</i>	7
1.1.3.4.4	Exozytose und Transzytose.....	7
1.1.3.4.5	An zytotischen Prozessen beteiligte Kompartimente	7
1.2	Modellsysteme zur Untersuchung des Arzneistofftransports an der Blut-Hirn Schranke	8
1.2.1	<i>In vivo</i> -Modelle	8
1.2.1.1	<i>Brain uptake index</i>	8
1.2.1.2	Gehirnperfusion	8
1.2.1.3	<i>Capillary depletion</i>	9
1.2.1.4	Mikrodialyse	9
1.2.2	<i>In vitro</i> -Modelle	9
1.2.2.1	Isolierte Kapillaren.....	9
1.2.2.2	Zellkulturmodelle.....	10
1.2.2.2.1	Kapillar-Endothelzellen	10
1.2.2.2.2	Experimenttypen	11
1.2.2.2.3	Optimierung des Zellkulturmodells mit Astrozyten-Kokultur und Astrozyten-konditioniertem Medium.....	12
1.2.2.2.4	Zelllinien	12
1.2.2.2.5	Weitere Zellkulturmodelle	12
1.3	<i>Drug targeting</i> zum Gehirn.....	13
1.3.1	Erhöhen der Lipophilie	13
1.3.2	Sequentieller Metabolismus.....	13
1.3.3	Ausnutzen existierender Carrierproteine	13
1.3.4	Öffnen der Blut-Hirn Schranke.....	14
1.3.5	Nanopartikel.....	14
1.3.6	Chimäre Peptide.....	15

1.3.7	Liposomale Konjugate	15
1.4	Liposomen	15
1.4.1	Aufbau und Herstellung von Liposomen	16
1.4.1.1	Phospholipide und weitere Membranlipide	16
1.4.1.2	Phasenübergangstemperatur	17
1.4.1.3	Herstellung von Liposomen	18
1.4.1.4	Arzneistoffeinschluss in Liposomen	18
1.4.2	<i>In vivo</i> Verteilung von Liposomen	19
1.4.3	Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen	20
1.4.4	Liposomale Konjugate für ein spezifisches <i>drug targeting</i>	21
1.4.4.1	Nicht-kovalente Kopplungsmethoden	21
1.4.4.2	Kovalente Kopplungsmethoden	22
1.4.5	Charakterisierung von Liposomen und liposomalen Konjugaten	24
1.4.6	Untersuchung der Wechselwirkung von liposomalen Konjugaten mit Zellen	25
1.4.7	Liposomale Konjugate für ein <i>drug targeting</i> zum Gehirn	26
1.5	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Materialien und Methoden	28
2.1	Substanzen	28
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.2	Lipide für die Liposomenherstellung	35
2.1.3	Linkerlipid	35
2.1.4	Fluoreszenzmarker für Liposomen	35
2.1.4.1	5(6)-Carboxyfluoreszein	35
2.1.4.2	Rhodamin B-DL- α -dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin	36
2.2	Geräte und Materialien	37
2.2.1	Fluoreszenzmikroskop	37
2.2.2	Konfokale Lasermikroskopie	37
2.2.3	Weitere Geräte und Materialien	37
2.3	Zellkultur	39
2.3.1	Isolierung von Kapillar-Endothelzellen aus Schweinehirn	39
2.3.2	Gewinnung von Astrozyten-konditioniertem Medium	41
2.3.3	Isolierung von Kapillaren aus Schweinehirn	41
2.3.4	Kultivierung von Kapillar-Endothelzellen	42
2.3.4.1	Vorbehandlung der Zellkulturgefäße	42
2.3.4.2	Zellkultivierung	42
2.3.5	Charakterisierung von Kapillar-Endothelzellen	42

2.3.5.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild	42
2.3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von charakteristischen Proteinen	43
2.3.5.3 Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität	43
2.3.5.4 Bestimmung des Proteingehaltes	44
2.3.5.5 Bestimmung des transendothelialen Widerstandes.....	44
2.3.5.6 Transport-Experimente mit fluoreszierenden Substanzen	44
2.3.5.6.1 Transport-Experimente im Diffusionskammer-System	44
2.3.5.6.2 Transport-Experimente in Transwell®-clear Kulturgefäßen.....	46
2.3.5.7 Transport-Experimente mit nicht fluoreszierenden Substanzen	46
2.4 Kationisiertes Albumin als Vektor.....	47
2.4.1 Synthese von kationisiertem Albumin	47
2.4.2 Fluoreszenzmarkierung von kationisiertem Albumin.....	47
2.4.3 Charakterisierung von kationisiertem Albumin und fluoreszenzmarkiertem kationisiertem Albumin	48
2.4.3.1 Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.4.3.2 Isoelektrische Fokussierung	49
2.4.3.3 Bestimmung des molaren Verhältnisses FITC : CBSA in FITC-CBSA	49
2.4.4 Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Albumin und kationisiertem Albumin in Endothelzellen	50
2.4.5 Sulfhydrierung von Albumin und kationisiertem Albumin	50
2.5 Herstellung von Liposomen und Proteinkopplung	51
2.5.1 Herstellung von Liposomen.....	51
2.5.1.1 Ultraschallmethode.....	51
2.5.1.2 Extrusionsmethode	52
2.5.2 Abtrennung von nicht eingeschlossenem 5(6)-Carboxyfluoreszein	52
2.5.3 Proteinkopplung.....	52
2.5.4 Abtrennung von ungebundenem Protein	52
2.6 Charakterisierung von Liposomen und Protein-Liposomen	52
2.6.1 Bestimmung der Größenverteilung durch Photonenkorrelationsspektroskopie ...	52
2.6.2 Lipidkonzentration	53
2.6.3 5(6)-Carboxyfluoreszein-Gehalt	53
2.6.4 Proteingehalt	53
2.6.5 Liposomenstabilität.....	55
2.6.6 Zeta-Potenzial	55
2.7 Untersuchung der Wechselwirkung von Protein-konjugierten Liposomen mit der Blut-Hirn Schranke <i>in vitro</i>	55
2.7.1 Aufnahme-Experimente mit BCECs und Gehirn-Kapillaren	55

2.7.1.1 Fluoreszenzmikroskopie	55
2.7.1.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	55
2.7.1.3 Fluoreszenzassays	56
2.7.2 Transport durch BCECs.....	56
3 Ergebnisse und Diskussion.....	58
3.1 Kultivierte Endothelzellen aus Gehirnkapillaren des Schweins als <i>in vitro</i> -Modell der Blut-Hirn Schranke	58
3.1.1 Isolierung von BCECs	58
3.1.2 Kultivierung von BCECs	60
3.1.3 Charakterisierung von BCECs.....	61
3.1.3.1 Nachweis von Vimentin.....	61
3.1.3.2 Nachweis des von Willebrand-Faktors	62
3.1.3.3 Aktivität der γ -Glutamyltransferase.....	63
3.1.4 Untersuchung und Optimierung der Dichte von auf Filtern kultivierten BCECs.....	65
3.1.4.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Transport-Experimenten.....	65
3.1.4.2 Vergleich zwischen Transwell®-Snapwell® und Transwell®-clear Filtereinsätzen	65
3.1.4.3 Einfluss der Molekülgröße auf die Transportrate	68
3.1.4.4 Einfluss von serumfreiem Medium und Hydrocortison auf die Zelldichte	70
3.1.4.5 Einfluss von Astrozyten-konditioniertem Medium und cAMP auf den Transport von FITC-Dextran 4000	75
3.1.4.6 Einfluss des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid auf die Integrität der Zellmonolayer	77
3.1.5 Einsatz des Zellkulturmodells für die Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen.....	78
3.1.5.1 Einsatz des Zellkulturmodells für das Screening von neuen Arzneistoffen	78
3.1.5.2 Untersuchung von p-Glykoprotein-abhängigen Transportprozessen	79
3.1.5.3 Untersuchung des Transports von Salicylsäure und Salicylsäure-Glucosid.....	80
3.2 Kationisiertes Albumin als Vektor.....	82
3.2.1 Eigenschaften von kationisiertem Albumin.....	82
3.2.2 Untersuchung der Aufnahme von CBSA in BCECs.....	83
3.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von FITC-CBSA in BCECs	83
3.2.2.2 Aufnahme-Experimente mit FITC-BSA und FITC-CBSA in Mikrotiterplatten	84
3.2.2.3 Beeinflussung der Messung mit dem Fluoroskan II durch die Plattengeometrie	85

3.3	Herstellung und Charakterisierung von liposomalen Konjugaten	87
3.3.1	Sulfydrierung von Albumin und kationisiertem Albumin	87
3.3.2	Eigenschaften von Liposomen	89
3.3.2.1	Vesikelgröße	90
3.3.2.2	Einschluss von 5(6)-Carboxyfluoreszein	91
3.3.2.3	Stabilität von DSPE-PEG-MI	92
3.3.2.4	Proteinkopplung	93
3.3.2.5	Liposomenstabilität	97
3.3.3	Mikroskopische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit kultivierten Kapillar-Endothelzellen	101
3.3.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	101
3.3.3.2	Konfokale Mikroskopie	103
3.3.4	Konfokalmikroskopische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit isolierten Hirnkapillaren	106
3.3.5	Fluorimetrische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit kultivierten Kapillar-Endothelzellen in Mikrotiterplatten	108
3.3.5.1	Linearität der Messmethode	108
3.3.5.2	Zeitabhängigkeit der Interaktion von CBSA-Liposomen mit BCEC-Monolayern	109
3.3.5.3	Unterscheidung von Bindung und Aufnahme	110
3.3.5.4	Abhängigkeit von der Vesikelgröße	111
3.3.5.5	Inhibition der Interaktion zwischen CBSA-Liposomen und BCECs	112
3.3.5.6	Abhängigkeit der Aufnahme von der Liposomenkonzentration	114
3.3.5.7	Beeinflussung der Aufnahme von CBSA-konjugierten Liposomen in BCEC-Monolayer durch PGP-/MRP-Substraten sowie durch CBSA	115
3.3.5.8	Einfluss von BSA und CBSA auf die konzentrationsabhängige Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer	116
3.3.5.9	Einfluss von CBSA auf die Aufnahme verschiedener Liposomentypen	117
3.3.5.10	Einfluss von CBSA auf die Aufnahme von verschiedenen Pinozytoseindikatoren	118
3.3.5.11	Zeta-Potenzial von BSA- und CBSA-gekoppelten Liposomen	119
3.3.6	Transport von Liposomen durch BCEC-Monolayer	120
4	Zusammenfassung	124
5	Anhang	125
6	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungen

ACM	Astrozyten-konditioniertes Medium
AM	Zellkulturmedium für Astrozyten
AZM	Anzuchtmedium für BCECs
BCECs	Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (<i>brain capillary endothelial cells</i>)
BHS	Blut-Hirn Schranke
BLS	Blut-Liquor Schranke
BSA	Rinder-Serumalbumin
CBSA	kationisiertes Rinder-Serumalbumin
CF	5(6)-Carboxyfluoreszein
CH	Cholesterol
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSPC	Distearoyl-phosphatidylcholin
DSPE –MPEG	Distearoyl-phosphatidylethanolamin-methylpolyethylenglykol
EM	Zellkulturmedium für BCECs
FD-X	FITC-Dextran (Molekulargewicht X.000)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GGT	γ -Glutamyl-Transferase
GLUT	passives Glucose-Transportprotein (<i>glucose transporter</i>)
HBSS	Pufferlösung nach Hank pH 7,4 (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HC	Hydrocortison
LUV	große, unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
MEM	Minimalmedium (<i>minimal essential medium</i>)
MLV	multilamellare Vesikel (<i>multilamellar vesicles</i>)
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
P _{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient
PE	Phosphatidylethanolamin
PBS	isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (<i>phosphate buffered saline</i>)
PGP	p-Glykoprotein
RES	retikuloendotheliales System
Rh-PE	Rhodamin-dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin
SATA	N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat
SP	saurer Waschpuffer pH 3
SPC	Phosphatidylcholin aus Sojabohnen
SUV	kleine, unilamellare Vesikel (<i>small unilamellar vesicles</i>)
T _c	Phasenübergangstemperatur
TEER	transendothelialer Widerstand (<i>transendothelial electrical resistance</i>)
TP	Transportpuffer pH 7,4
vWF	von Willebrand-Faktor

1 EINLEITUNG

Durch die medizinischen Fortschritte in den letzten 100 Jahren hat sich die durchschnittliche Lebenserwartung der Menschen in den Industrienationen deutlich erhöht. Umso älter der Mensch wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass er von einer degenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems betroffen wird. Krankheiten wie die Alzheimer-Demenz oder das Parkinson-Syndrom werden in den nächsten Jahren noch an Bedeutung zunehmen und verursachen schon heute durch die Pflegebedürftigkeit der Patienten immense Kosten für die Gesundheitssysteme. So belaufen sich die jährlichen durch Alzheimer entstehenden Kosten allein in den USA auf 50 Mrd. Dollar [56].

Mit der Entwicklung von Arzneistoffen gegen diese Krankheiten könnte die Lebensqualität der Patienten entscheidend verbessert werden; darüber hinaus würden die Pflegekosten drastisch reduziert. Aber selbst wenn die Mechanismen, die den Erkrankungen zugrunde liegen, erforscht sind und wirksame Substanzen gefunden sind, besteht das Problem, dass das Gehirn vom restlichen Organismus weitgehend „abgeschottet“ ist und es somit von der Hirngängigkeit der Substanz abhängt, inwieweit sie tatsächlich wirken kann.

1.1 Barrieren des Arzneistofftransports zum Gehirn

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Paul Ehrlich, dass sich nach Injektion eines Farbstoffs der gesamte Organismus des Versuchstieres mit Ausnahme des zentralen Nervensystems anfärbte [52]. Diese Beobachtung führte in den folgenden Jahrzehnten zu den unterschiedlichsten Vorstellungen über die Blut-Hirn Schranke [39].

Heute weiß man, dass die Blut-Hirn Schranke (BHS) von den mit *tight junctions* verbundenen Endothelzellen der Kapillaren des zentralen Nervensystems gebildet wird. Diese Kapillaren durchziehen das Hirngewebe in einem durchschnittlichen Abstand von 40 μm und haben eine Gesamtlänge von ca. 600 km [151]. Die BHS hat die Aufgabe, die Versorgung des Gehirns sicherzustellen und ein Eindringen schädlicher Substanzen zu verhindern.

Die Kapillaren einiger Areale des Gehirns, der sogenannten zirkumventrikulären Organe, weisen keine *tight junctions* auf und erlauben somit einen freien Austausch von Substanzen zwischen Blut und umliegendem Gewebe. Hierzu gehören unter anderem Hypothalamus, Hypophyse und Epiphyse, in denen neuroendokrine Substanzen an das Blut abgegeben werden, und der *plexus choroideus*. Dieser wird auch als Blut-Liquor Schranke (BLS) bezeichnet; hier schließt sich an das Endothel ein dichtes Epithel an. Die Arachnoidmembran stellt eine weitere Barriere zwischen Blut und Liquor dar.

1.1.1 Vergleich von Blut-Hirn Schranke und Blut-Liquor Schranke

Der Aufbau der BHS und der BLS ist in Abbildung 1.1 vergleichend dargestellt.

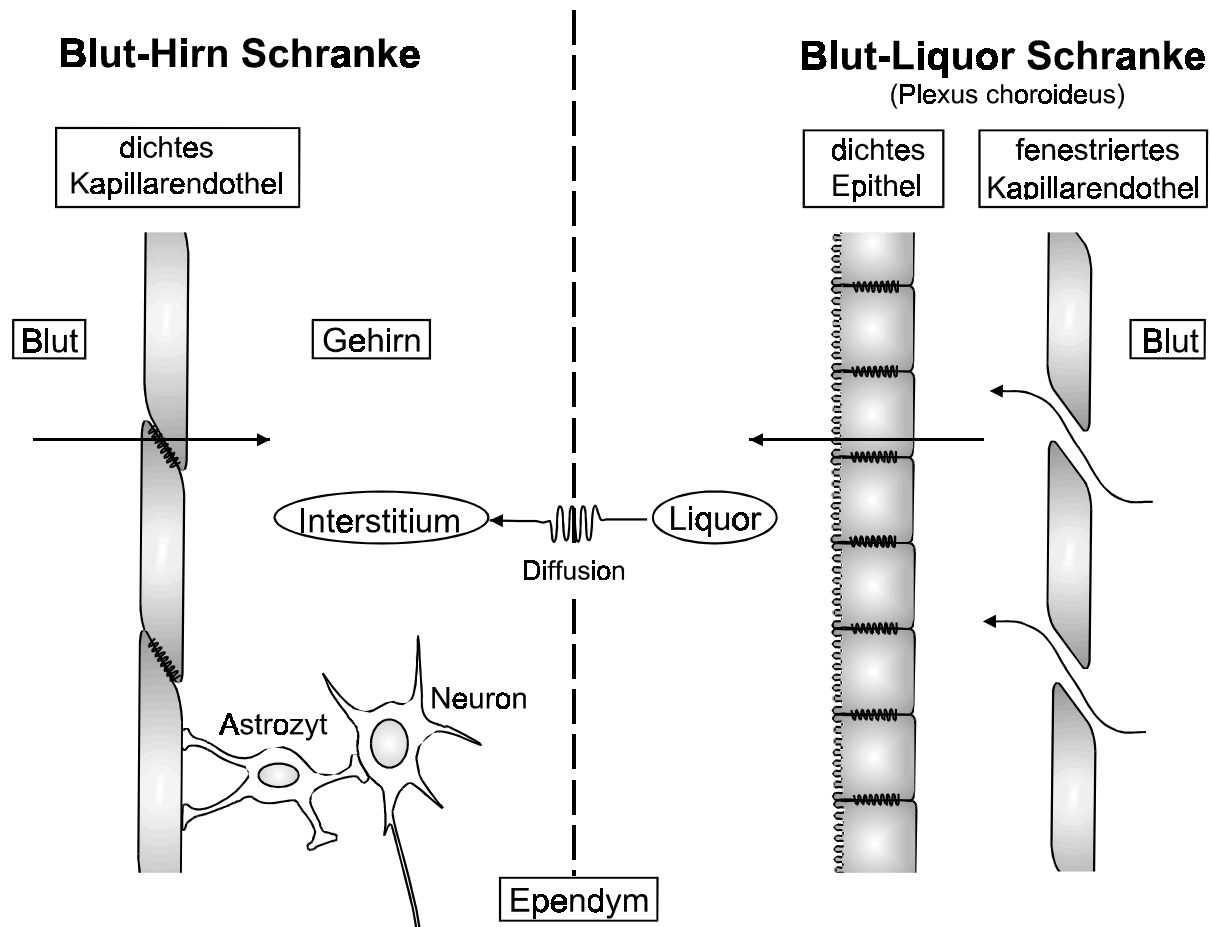


Abbildung 1.1: Vergleich von Blut-Hirn Schranke und Blut-Liquor Schranke

Die Hirnventrikel und der Subarachnoidalraum sind mit Liquor gefüllt. Der Großteil des Liquors wird vom Epithel des *plexus choroideus* gebildet, der in den vier Hirnventrikeln lokalisiert ist. Durch den Liquor ist das Gehirn im Schädel schwimmend gelagert und gegen Beschädigungen bei schnellen Bewegungen geschützt. Das Gesamtvolumen des Liquors beträgt ca. 100 ml und wird am Tag 4 - 5 mal ausgetauscht [153].

Die Epithelzellen der BLS sind über *tight junctions* miteinander verbunden (Abbildung 1.1) und mit der Ependymschicht verbunden, die die Neuronen und Gliazellen des Gehirns gegen die Ventrikelhohlräume abgrenzt. Durch das Ependym ist ein langsamer Stoffaustausch zwischen interstitieller Flüssigkeit des Gehirns und dem Liquor fast uneingeschränkt möglich. Daraus resultiert eine weitgehend identische Zusammensetzung von Liquor und interstitieller Flüssigkeit. Der *plexus choroideus* wird durchblutet von Kapillaren des fenestrierten Typs. Das Epithel verfügt auf der apikalen Seite über *microvilli* und ist mit Transportsystemen für Ionen, Vitamin C, Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren, Folsäure und Vitamin B₆ ausgestattet.

Die Endothelzellen der BHS besitzen ebenfalls *tight junctions* und trennen das Blut von der interstitiellen Flüssigkeit. Die basolaterale Seite der Endothelzellen steht in Kontakt zu Astrozytenausläufern (vgl. 1.1.2). Die Endothelzellen verfügen unter anderem über Transportsysteme für Glucose und Aminosäuren (vgl. 1.1.3.2).

BHS und BLS haben die Aufgabe, das Milieu des Gehirns auch unter kritischen Bedingungen konstant zu halten und es mit Nährstoffen zu versorgen. Die Substanzen, die schnell in hohen Konzentrationen benötigt werden, werden dabei durch die BHS transportiert. Dagegen wird der Transport der Substanzen, die das Gehirn langfristig und nur in geringen Konzentrationen benötigt, von der BLS übernommen [184]. Diese Aufgabenteilung zeigt sich auch im Oberflächenverhältnis: Die innere Oberfläche der dichten Kapillaren der BHS ist etwa 5000 mal größer als die der fenestrierten Kapillaren aller zirkumventrikulären Organe [18]. Aus diesem Grund wird dem BHS-Endothel für den Arzneistofftransport zum Gehirn die größere Bedeutung beigemessen.

1.1.2 Zelluläre Umgebung der Blut-Hirn Schranke

Neben den Kapillar-Endothelzellen selbst sind weitere Strukturelemente für die Funktion der BHS wichtig. Abbildung 1.2 zeigt den Querschnitt durch eine Kapillare mit Astrozytenausläufern, Perizyt und Basalmembran sowie den mit *tight junctions* verbundenen Endothelzellen.

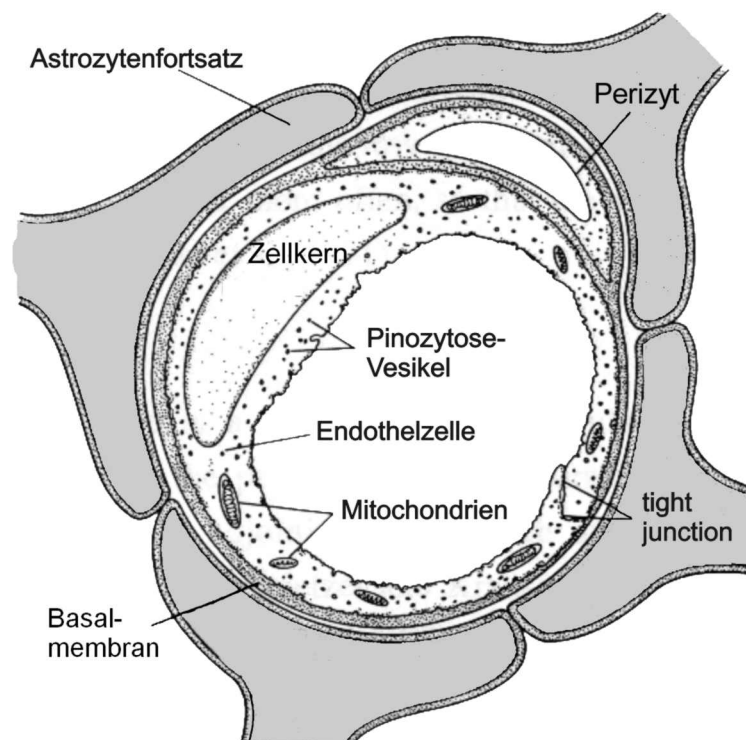


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Gehirnkapillare (aus [152])

Astrozyten gehören zur Glia des zentralen Nervensystems, die ca. 50 % aller Zellen des ZNS ausmacht. Sie treten über fußartige Ausläufer mit Neuronen und Kapillaren in Kontakt. Dabei werden Astrozyt und Endothelzelle durch die Basalmembran getrennt, so dass kein direkter Kontakt besteht. Etwa 80 % der Kapillaroberfläche sind mit Astrozytenausläufern bedeckt [194]. Die Astrozyten haben selbst keine Barrierefunktion, üben aber wahrscheinlich eine Kontrollfunktion auf die Endothelzellen aus. Unter anderem sollen sie die Dichte der *tight junctions* regulieren und die Expression von Enzymen wie γ -Glutamyl-Transferase (GGT) und Transportproteinen [89] induzieren. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. Weiterhin regulieren Astrozyten das Ionenmilieu des Extrazellulärraums im Gehirn, um die neuronale Funktion sicherzustellen.

Perizyten, auch Adventitiazellen genannt, sind spiralförmig um die Endothelzellen angeordnet und mit in die Basalmembran eingeschlossen. Von den Endothelzellen sind sie ebenfalls durch die Basalmembran getrennt. Perizyten besitzen kontraktile Eigenschaften und sind zur Phagozytose befähigt [55]; ihre genaue Funktion an der BHS ist noch nicht bekannt.

Die Basalmembran ist eine Extrazellulärmatrix, die Perizyten und Endothelzellen umgibt. Sie wird von den Zellen gebildet und besteht im wesentlichen aus Kollagen und Fibronectin. Neben der Stützfunktion ist sie mit an der Barrierefunktion beteiligt [45].

Tight junctions bilden interzelluläre Verbindungen zwischen Endothel- und Epithelzellen. Sie schließen Lücken zwischen den Zellen und schränken somit die parazelluläre Diffusion auch von niedermolekularen Substanzen stark ein. Für die Funktion der BHS sind sie essenziell [172]. Sie bewirken einen außerordentlich hohen transendothelialen Widerstand (TEER) von bis zu $2000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ [37]. Eine weitere Funktion ist die Aufrechterhaltung der Verteilung von Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran [13]. Der Aufbau von *tight junctions* ist außerordentlich komplex und noch nicht vollständig bekannt.

1.1.3 Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke

In Abbildung 1.3 sind die an den Endothelzellen der BHS ablaufenden Transportprozesse schematisch dargestellt.

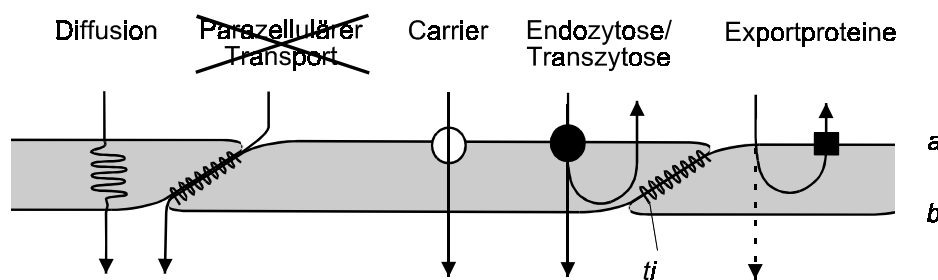


Abbildung 1.3: Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke (a apikale Zellmembran (Blutseite); b basolaterale Zellmembran (Hirnseite); tj *tight junction*)

1.1.3.1 Passive Diffusion

Praktisch jedes Molekül kann einem Konzentrationsgradienten folgend durch eine Lipid-Doppelmembran und somit letztlich auch durch eine Zellschicht hindurch diffundieren. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Vorgang abläuft, hängt von mehreren Parametern wie Molekulargewicht, Form oder Ladung der Substanz ab. Generell diffundiert ein Molekül umso schneller, je kleiner und lipophiler es ist. Das Diffusionsvermögen einer Substanz lässt sich durch Bestimmung des Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten [144] oder der Wasserstoff-Bindungszahl [153] abschätzen.

1.1.3.2 Transport durch Carrierproteine

Nährstoffe und andere endogene Substanzen gelangen über spezielle, in der Zellmembran lokalisierte Transportproteine in das Zytosol. Dieser Transport kann sowohl passiv als auch aktiv sein. Von einem aktiven Transport spricht man, wenn eine Substanz gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert wird. Die dazu benötigte Energie wird in der Regel durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Die wichtigsten Transportproteine in den apikalen und basolateralen Membranen der Kapillar-Endothelzellen sind die für Glucose und Aminosäuren.

Glucose ist die Hauptenergiequelle des Gehirns. Somit muss die kontinuierliche und ausreichende Glucoseversorgung des Gehirns durch die Kapillar-Endothelzellen sichergestellt werden. Das Glucose-Transportprotein an der BHS gehört zur Familie der GLUT-Transportproteine, die Glucose passiv mit einem Konzentrationsgefälle transportieren [160]. Aminosäuren werden als Bausteine für die Proteinbiosynthese benötigt. An der BHS existieren Transportproteine für neutrale und basische [156] Aminosäuren. Weiterhin existieren an der BHS Transportproteine für Monocarbonsäuren [142], Cholin [35], Glutamat [149], Purinbasen sowie Purinnukleoside [34].

1.1.3.3 Exportproteine

Eine Vielzahl von Substanzen weist trotz ausreichender Lipophilie nur eine geringe Permeabilität an der BHS auf. Nähere Untersuchungen dieses Phänomens führten zu der Erkenntnis, dass diese Moleküle zwar in die Endothelzellen hinein gelangen, dort jedoch zum Teil von einem membranständigen Carrierprotein erkannt und wieder aktiv aus der Zelle transportiert werden. Dieses Transportprotein ist das p-Glykoprotein (PGP, Produkt des *mdr1*-Gens), das auch für die Resistenzbildung von Krebszellen gegen Zytostatika verantwortlich ist. Daher stammt auch die Bezeichnung *multidrug resistance protein*. Neben p-Glykoprotein wird auch das Vorkommen des verwandten *multidrug resistance associated*-Proteins MRP an der BHS diskutiert [80, 170, 178]. Für Morphin-6-glucuronid [85, 87], Colchicin und Vinblastin [47] konnte gezeigt werden, dass die geringe Permeabilität an der BHS auch auf die Präsenz von PGP zurückzuführen ist.

1.1.3.4 Zytotische Prozesse

Endozytose ist die Aufnahme extrazellulärer Partikel und Flüssigkeiten in aus der Zellmembran stammende Vesikel. Die Aufnahme von großen Partikeln wie Bakterien oder abgestorbenen Zellen bezeichnet man als Phagozytose. Hierbei umschließt die Zellmembran den an die Zelloberfläche gebundenen Festkörper durch Membranausstülpungen, bis er sich im Zellinneren befindet. Phagozytose spielt eine wesentliche Rolle für das Immunsystem. Nur wenige spezialisierte Zelltypen sind zur Phagozytose befähigt, z.B. Makrophagen, Granulozyten oder Perizyten. Die unspezifische Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Moleküle in Rahmen der kontinuierlichen Regeneration der Zellmembran wird Pinozytose genannt. Ihr Ausmaß ist abhängig vom Zelltyp. Die Endothelzellen der BHS verfügen nur über eine geringe Pinozytoseaktivität. Die Endozytose von Molekülen beobachtet man bei den meisten Zelltypen, wobei primär zwischen rezeptorvermittelter und nicht-rezeptorvermittelter Endozytose unterschieden wird.

1.1.3.4.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Bestimmte Proteine der Zellmembran haben eine spezifische Affinität zu Polypeptiden, Polysacchariden, Glykolipiden, Proteinen oder anderen Molekülen [81] und werden als Rezeptoren bezeichnet. An Rezeptoren bindende Moleküle nennt man Liganden. Nachdem ein Ligand an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden hat, wird der entstandene Komplex internalisiert. Das entstandene intrazelluläre Vesikel wird als Endosom bezeichnet. Die Endosomen werden inhaltsabhängig verschiedenen Prozessen und Kompartimenten zugeführt. (siehe 1.1.3.4.5). Viele physiologische Liganden, wie LDL (*low density lipoprotein*), Transferrin oder EGF (*epithelial growth factor*) werden so in die Zelle aufgenommen.

1.1.3.4.2 Nicht-rezeptorvermittelte Endozytose

Die Aufnahme von Makromolekülen ist nicht immer an die Existenz eines Rezeptors gebunden. Diese Art der Internalisierung wird auch adsorptive Endozytose genannt. Makromoleküle, die über eine elektrostatische Ladung verfügen, können von der Zellmembran adsorbiert werden, da diese über kationische und anionische Regionen verfügt. Die Verteilung der geladenen Oberflächenbereiche ist nicht gleichmäßig [64]. Moleküle mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich 4,5 - 7,0 werden nicht adsorbiert [14]; außerhalb dieses Bereich ist eine Adsorption möglich. Da die äußere Zelloberfläche durch ihre kohlenhydratreichen Glykoproteine (z.B. Fucose oder Sialinsäure) insgesamt über eine negative Ladung verfügt, werden kationische Moleküle besser adsorbiert. Das Ausmaß der Adsorption und der sich anschließenden Endozytose ist vom Zelltyp abhängig. Der genaue Mechanismus der Internalisierung ist noch unklar. Beispiele für so aufgenommene Moleküle an der BHS sind kationisiertes Albumin [102, 159, 197] und Histon [158].

1.1.3.4.3 Coated pits und caveolae

Eine weitere Einteilung von endozytotischen Prozessen lässt sich nach der Region der Zellmembran treffen, an der die Endozytose stattfindet. Viele Moleküle, wie z.B. Transferrin oder LDL, werden in sogenannten *clathrin-coated pits* internalisiert. Dies sind Membraneinstülpungen mit einem Durchmesser von ca. 150 nm, die intrazellulär mit Clathrin beschichtet sind [134]. Ein Weg der Clathrin-unabhängigen Endozytose führt über *caveolae* und wurde u.a. für Folsäure beschrieben [9]. *Caveolae* wurden zunächst als kleine, Omega-förmige Membraneinstülpungen beschrieben [202]. Heute definiert man *caveolae* über ihre biochemische Zusammensetzung. *Caveolae* sind reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden und intrazellulären Membranproteinen, wie z.B. Caveolin [8].

1.1.3.4.4 Exozytose und Transzytose

Moleküle können durch Transport in Vesikeln auch wieder aus der Zelle ausgeschieden werden. Dieser Vorgang wird als Exozytose bezeichnet. In polarisierten Zellen, die als zelluläre Barrieren fungieren, ist eine kontrollierte Folge von Endozytose und Exozytose für den Transport von bestimmten Molekülen essenziell, um diese dem abgegrenzten Gewebe zuzuführen oder von dort abzutransportieren. Diese Art des Transports durch eine Zellschicht hindurch wird Transzytose genannt [135]. Transzytose wurde an der BHS u.a. für LDL [43], Transferrin [203, 30] und kationisiertes Albumin [182, 197] beschrieben.

1.1.3.4.5 An zytotischen Prozessen beteiligte Kompartimente

Zytotische Prozesse verlaufen unter Beteiligung vieler intrazellulärer Kompartimente. Die wichtigsten davon sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

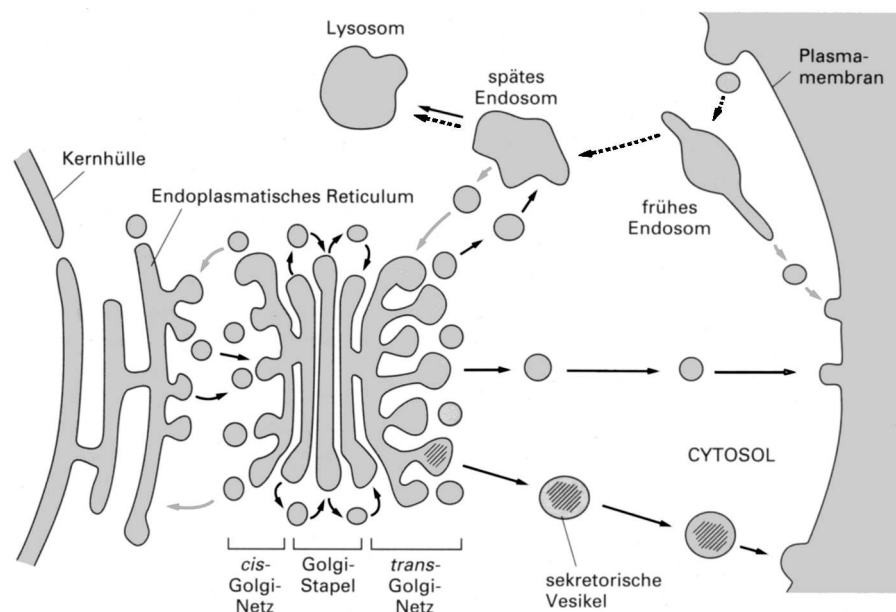


Abbildung 1.4: An zytotischen Prozessen beteiligte Kompartimente (aus [2])

Die unterbrochenen Pfeile beschreiben die Endozytose. Dieser Weg führt über primäre Endozytosevesikel, frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen. Mit dieser Umwandlung ist ein kontinuierlicher Abfall des vesikulären pH-Wertes verbunden [137]. Durch den sinkenden pH-Wert können Liganden von ihren Rezeptoren dissoziieren und die Rezeptoren, in andere Vesikel verpackt, wieder der Zellmembran zugeführt werden. Die Liganden werden entweder an das Zytosol abgegeben oder in den Lysosomen verdaut. Wichtig für den Transport der Vesikel ist das mikrotubuläre System der Zelle.

Die schwarzen Pfeile skizzieren die Exozytose eines im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteins. Dieser Weg führt durch die *cis*- und *trans*- Netze des Golgi-Apparats in sekretorische Vesikel, die schließlich mit der Zellmembran fusionieren. Ebenfalls möglich ist der Transport des Proteins zu den späten Endosomen und der anschließende lysosomale Abbau.

Die grauen Pfeile stellen die Möglichkeiten des Recyclings dar. So können Moleküle aus den frühen Endosomen zurück an die Zelloberfläche gelenkt werden. Ebenfalls möglich ist der Weg von den späten Endosomen über den Golgi-Apparat zurück in das endoplasmatische Retikulum. Die Endozytose und Transzytose vieler Moleküle verläuft abweichend von den beschriebenen Wegen und ist zudem vom genauen Aufnahmemechanismus abhängig [8, 135, 137].

1.2 Modellsysteme zur Untersuchung des Arzneistofftransports an der Blut-Hirn Schranke

1.2.1 *In vivo*-Modelle

1.2.1.1 *Brain uptake index*

Der *brain uptake index* (BUI) wird durch schnelle Injektion einer Mischung aus Test- und Referenzsubstanz (beide radioaktiv markiert) in die innere Carotisarterie ermittelt [141]. Das Versuchstier (Ratte) wird nach 5 – 15 s decapitiert und die Radioaktivität im Gehirn wird gemessen. Der BUI wird aus dem Verhältnis von Test- zu Referenzsubstanz in Gehirn und Injektion [153] berechnet. Aufgrund der kurzen Versuchszeit ist dieses Verfahren nur für Substanzen geeignet, die die BHS schnell überwinden.

1.2.1.2 Gehirnperfusion

Die zerebrovaskuläre Permeabilität kann durch die Perfusion der inneren Carotisarterie bestimmt werden. Dieses Verfahren wurde für Meerschweinchen [213] und Ratten [188] beschrieben. Durch den fehlenden Blutfluss wird die Metabolisierung der Testsubstanz durch Blutbestandteile minimiert. Die übliche Perfusionszeit beträgt in der Ratte 30 s, während im Meerschweinchen Zeiten bis zu 20 min. möglich sind [212].

1.2.1.3 *Capillary depletion*

Um bei der im Gehirn gemessenen Arzneistoffmenge zwischen Arzneistoff in den Kapillaren und im Extrazellularraum des Gehirns unterscheiden zu können, wurde die *capillary depletion*-Methode entwickelt [197]. Hierbei wird das Gehirn nach dem Experiment homogenisiert und durch eine Dextran-Zentrifugation fraktioniert. Die Kapillaren finden sich nach der Zentrifugation im Pellet, das Hirngewebe verbleibt im Überstand (vgl. 2.3.1).

1.2.1.4 Mikrodialyse

Eine Methode, den Arzneistofftransport in den Extrazellularraum des Gehirns zu messen, ist die Mikrodialyse [191]. Hierbei wird ein Dialyseschlauch in das Gehirn implantiert und perfundiert. Nach Injektion der Testsubstanz werden Proben des Perfusats gesammelt und analysiert. Mit dieser Methode sind lange Versuchszeiten (mehrere Stunden) möglich.

1.2.2 *In vitro*-Modelle

Da die *in vivo*-Situation an der BHS komplex ist und darüber hinaus weitere Faktoren (z.B. Plasmaproteinbindung) die Untersuchung der Transportmechanismen erschweren können, wurden verschiedene *in vitro*-Modelle zur Untersuchung des Arzneistofftransports in das Gehirn etabliert.

1.2.2.1 Isolierte Kapillaren

Die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Kapillaren aus dem Gehirn von Versuchstieren erlaubte erstmals die gezielte Untersuchung von Transportprozessen an der BHS *in vitro*. Die zur Verfügung stehenden Methoden zur Isolierung und Aufreinigung der Kapillaren sind vielfältig [27, 66, 136, 146, 157, 206]. Mit ihnen wurden zahlreiche Studien zur Physiologie, Biochemie und Entwicklungsbiologie der BHS durchgeführt [89] (Abbildung 1.5).

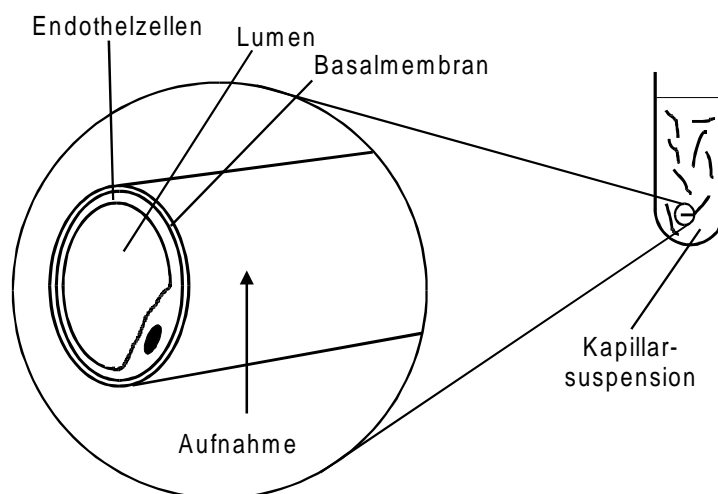


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Gehirn-Kapillaren in Suspension

Allerdings lässt sich mit diesem Modell nicht eindeutig differenzieren, ob die beobachtete Aufnahme in die intakten Kapillarfragmente von der basolateralen (Hirnseite) oder der apikalen (Blutseite) Membran erfolgt [189]. Da die basolaterale Membran für in der Lösung vorliegende Substanzen allerdings leicht zugänglich ist und außerdem das Kapillarlumen zumindest an den Enden deutlich kollabiert, sind die im Kapillarmodell erkannten Transportprozesse zum Großteil auf Vorgänge an der basolateralen Membran zurückzuführen [187]. Verunreinigungen durch andere Zelltypen [206] und der Verlust von metabolischer Aktivität während der Präparation [105] sind weitere Einschränkungen des Modells. So ist z.B. der Verlust von ATP durch die Schädigung der Zellen mit enzymatischen oder mechanischen Methoden für die Untersuchung energieabhängiger Prozesse kritisch [150].

1.2.2.2 Zellkulturmodelle

1.2.2.2.1 Kapillar-Endothelzellen

Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (BCECs; *brain capillary endothelial cells*) als Hauptbestandteil der BHS können aus den Gehirn-Kapillaren isoliert und in Kultur gehalten werden. Die Kultivierung von primären oder passagierten BCECs aus Maus [40], Ratte [25, 148], Rind [11, 44, 173], Mensch [22] und Schwein [85, 131] wurde beschrieben.

Die Isolierung der Zellen erfolgt durch mechanische oder / und enzymatische Dispergierung, gefolgt von Filtrations- oder Zentrifugationsschritten. Die Zellen wachsen in unterschiedlich zur Simulation der Basalmembran (siehe 1.1.2) vorbehandelten Kulturgefäßen in einer einzigen Zellschicht heran. Diese Monolayer weisen viele der charakteristischen Eigenschaften der BHS *in vivo* auf. So konnte gezeigt werden, dass primäre BCECs aus Rinderhirn *tight junctions*, eine geringe Pinozytoseaktivität und ein polarisiertes Wachstum aufweisen [173, 12]. Auch das Vorkommen charakteristischer Enzyme und Proteine, wie der GGT, der alkalischen Phosphatase oder des von Willebrand-Faktors wurde demonstriert [11]. Ähnlich gut charakterisiert sind Primärkulturen aus Schweinehirn [85, 131].

Diese beiden Modelle haben sich gegenüber denen anderer Spezies durchgesetzt, da Rinder- und Schweinehirne bei Schlachthöfen einfach zu erhalten sind, und eine große Zahl von Zellen (mehr als 10 Mio. Zellen pro Hirn) isoliert werden kann. Dagegen lassen sich aus 6 - 10 Rattenhirnen maximal 5 Mio. Zellen gewinnen [108]. Bei Hirnmaterial vom Menschen steht nur eine geringe Menge zur Verfügung, da das Gewebe aus Biopsien stammt (1,0 - 1,8 g) [22]. Darüber hinaus stammen die Gewebeproben aus unterschiedlichen Hirnregionen, was eine Vergleichbarkeit der Experimente erschwert. Zudem erfordert die Arbeit mit lebendem humanen Gewebe wegen der erhöhten Infektionsgefahr besondere Sicherheitsvorkehrungen. Da die Zellen im Laufe der Kultur langsam dedifferenzieren und die typischen Eigenschaften der BHS verlieren, sind Primärkulturen passagierten Zellen vorzuziehen.

1.2.2.2 Experimenttypen

Prinzipiell lassen sich mit den kultivierten Zellen zwei unterschiedliche Typen von Experimenten durchführen. Werden die BCECs in Kulturschalen gezüchtet, kann man Aufnahme-Experimente analog zur *in vivo*-Situation von der Blutseite in die Endothelzellen durchführen (Abbildung 1.6).

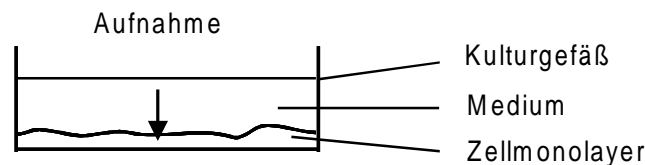


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines Aufnahme-Experiments

Kultiviert man die Endothelzellen auf feinporösen Membranfiltern, erhält man die Möglichkeit, Transportstudien durchzuführen. (Abbildung 1.7).

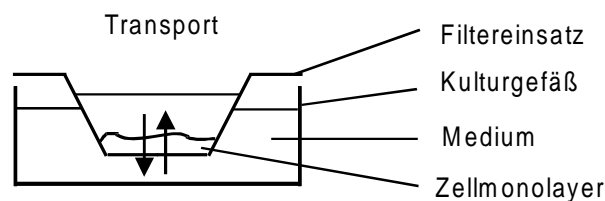


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung eines Transport-Experiments

Transport-Experimente können sowohl in den Kulturbedingungen direkt, als auch in speziellen Diffusionskammer-Systemen durchgeführt werden. Die Kulturplatten mit Filtereinsätzen sind von mehreren Herstellern erhältlich. Die verwendeten Filter unterscheiden sich hinsichtlich ihres Materials, der Porendichte und der Porengröße. Das vertikale Diffusionskammer-System der Firma Corning-Costar [67, 92] stellt eine Weiterentwicklung der Diffusionskammer von Ussing [200] dar. Bei dem Corning-Costar-System sind die unteren Hälften des Filtereinsatzes für die Zellkulturplatten abnehmbar und können in kleine Diffusionskammern aus Plexiglas eingespannt werden. Sechs der Kammern werden zusammen in einen Heizblock gestellt und jede Halbzelle wird mit einem regulierbaren Gasfluss durchmischt (Abbildung 1.8).

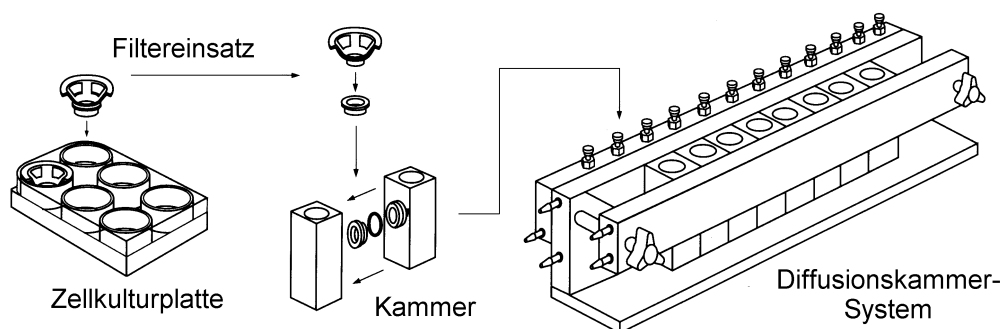


Abbildung 1.8: Diffusionskammer-System (Produktinformation Fa. Corning-Costar)

1.2.2.2.3 Optimierung des Zellkulturmodells mit Astrozyten-Kokultur und Astrozyten-konditioniertem Medium

BCECs verlieren in Kultur schnell ihre typischen Eigenschaften; außerdem werden die *tight junctions* nicht so dicht wie *in vivo* (TEER meist kleiner als $100 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ [97, [169]). Dies ist vor allem für Transport-Experimente von Nachteil, da Permeabilitäten tendenziell überschätzt werden. Da Astrozyten *in vivo* einen wichtigen regulativen Einfluss auf die Funktion der Endothelzellen haben (siehe 1.1.2), wurde versucht, diesen Einfluss auch für die Zellkultur nutzbar zu machen. Hierfür gibt es zwei Ansätze: Die Kokultur mit Astrozyten [44] und die Kultivierung mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) [173]. Durch die Verwendung des konditionierten Mediums in Verbindung mit einem cAMP-Analagon sowie eines Phosphodiesterase-Hemmstoffs konnte der TEER auf über $600 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ gesteigert werden. Durch die Kokultur mit Astrozyten auf der Rückseite des Filters konnte die Permeabilität von Inulin deutlich reduziert werden. Ähnliche Effekte sowie eine erhöhte Aktivität der GGT ließen sich auch mit C6-Gliomzellen, einem aus Astrozyten hervorgegangenen Rattentumor, bzw. mit C6-konditioniertem Medium erzielen [132, 169]. Als weitere Ansätze, die Komplexität der BHS *in vitro* nachzubilden, wurden Kokulturen von BCECs mit Neuronen [51] sowie Kokulturen mit Astrozyten und Perizyten beschrieben [130].

1.2.2.2.4 Zelllinien

Zelllinien werden entweder durch die Immortalisierung normaler Zellen oder aus Tumoren gewonnen. Sie haben gegenüber den primären BCECs den Vorteil, dass sie sich passagieren lassen, ohne ihre Eigenschaften wesentlich zu verändern. So kann auf eine regelmäßige Zellisolierung verzichtet werden. In der Literatur beschriebene Zelllinien als Modelle für die BHS sind CR3-Zellen [107] und RBE4-Zellen [171] aus der Ratte sowie eine Zelllinie aus transformierten humanen BCECs [138]. Im Vergleich zu Monolayern aus primären BCECs werden bislang niedrigere TEERs gemessen, weiterhin sind die Zelllinien im Hinblick auf Enzymausstattung und Transportprotein-Funktion meist unzureichend charakterisiert.

1.2.2.2.5 Weitere Zellkulturmodelle

Auch die Kultur von endothelialen Zelllinien wurde mit Astrozyten [53] kombiniert. Ebenso wurde versucht, in Endothelzellen nicht zentralen Ursprungs BHS-Eigenschaften durch Kokultur mit Gliomzellen [82] oder Astrozyten [75] zu induzieren. Auch eine Epithelzelllinie, MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), wurde in Verbindung mit C6-Zellen als *in vitro*-Modell der BHS genutzt [204]. Insbesondere bei letztgenanntem Modell ist jedoch fraglich, inwieweit noch Ähnlichkeit mit der *in vivo*-Situation vorhanden ist und inwieweit C6-Zellen in der Lage sind, die an der BHS vorhandenen Transportsysteme zu induzieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kultur von primären BCECs heute das meistverbreitete und anerkannteste Modell der BHS ist.

1.3 Drug targeting zum Gehirn

Verschiedene Strategien können angewendet werden, um die Permeation eines Arzneistoffs durch die BHS zu verbessern. Die Möglichkeiten reichen von Modifikationen des Arzneistoffes, die zu einer unspezifisch erhöhten Membrangängigkeit führen, bis zu spezifischen Delivery-Systemen.

1.3.1 Erhöhen der Lipophilie

Da das Ausmaß der Diffusion durch Biomembranen vom Molekulargewicht und der Lipophilie des Arzneistoffs abhängig ist, kann die Hirngängigkeit durch das Einfügen von lipophilen Gruppen verbessert werden. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Diacetylierung von Morphin zu Heroin, die eine 25-fach erhöhte Aufnahme ins Gehirn bewirkt [143].

1.3.2 Sequentieller Metabolismus

Eine besondere Form der Verbesserung des Diffusionsverhaltens stellt der sequentielle Metabolismus redoxbasierter Systeme dar. Hierbei wird der Arzneistoff kovalent an 1,4-Dihydrotrigonellinat und zusätzlich an ein lipophiles Trägermolekül gebunden. Dieses lipophile Konstrukt ist in der Lage, durch die BHS und andere zelluläre Barrieren zu diffundieren. Eine Rückdiffusion wird durch die Oxidation des Trigonellinats analog zur Oxidation des Coenzyms NADH zu NAD^+ verhindert. So kann die Verbindung im Gehirn verbleiben und nach Hydrolyse der Ester- oder Amidbindungen zu den Trägermolekülen den Wirkstoff freigeben. Experimentell wurde die Anwendbarkeit des Systems für Enkephaline [23], Estradiol [167], Dopamin [31] sowie die Virustatika Ganciclovir [28] und Zidovudin [29] gezeigt.

1.3.3 Ausnutzen existierender Carrierproteine

Das Transportprotein für neutrale Aminosäuren wird für die Behandlung des Morbus Parkinson ausgenutzt. Dopamin selbst wird nicht an der BHS transportiert und zudem schnell durch die Enzyme Monoaminoxidase und Katecholamin-O-Methyltransferase metabolisiert. Die Aminosäure L-Dopa jedoch wird von dem Carrierprotein erkannt und im Gehirn zu Dopamin umgesetzt. Dieses Dopamin kann dann von den Neuronen in der *substantia nigra* aufgenommen werden und den Neurotransmitter-Mangel ausgleichen. Ebenfalls durch das Carrierprotein für neutrale Aminosäuren transportiert werden das Zytostatikum Melphalan, der antiepileptisch wirkende Arzneistoff Gabapentin [18] und das Muskelrelaxans Baclofen [42]. Da Carrierproteine jedoch nicht beliebig große Moleküle transportieren können, und ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmung mit den physiologischen Substraten gegeben sein muss, ist diese Strategie nur eingeschränkt anwendbar.

1.3.4 Öffnen der Blut-Hirn Schranke

Durch kurze Infusion einer hyperosmotischen Lösung (z.B. Mannitol, Arabinose) in die Halsschlagader kann die BHS geöffnet werden. Die Endothelzellen schrumpfen durch die hyperosmotische Lösung und geben so parazelluläre Kanäle frei. Diese Technik wurde in Verbindung mit der Infusion von Chemotherapeutika zur Behandlung von Hirntumoren genutzt [69]. Auch Polymere mit einem Molekulargewicht über 700.000 können so besser in das Gehirn gelangen [10]. Das Peptid Bradykinin erhöht die Permeabilität der BHS durch eine Öffnung der *tight junctions*. Dieser Effekt soll rezeptorvermittelt sein [198]. Eine ähnliche Erhöhung der Durchlässigkeit konnte mit Leukotrienen, Histamin und 5-Hydroxytryptamin erzielt werden [18]. Durch diese Methoden wird die BHS unspezifisch für alle im Blut zirkulierenden Substanzen geöffnet und verliert kurzfristig ihre Schutzfunktion. Somit ist eine regelmäßige Anwendung des Verfahrens mit einem hohen Risiko behaftet.

1.3.5 Nanopartikel

Nanopartikel sind feste Körper aus Polymeren im Größenbereich von 10 nm bis 1 µm. Sie können auf unterschiedliche Weise dargestellt und mit Arzneistoffen beladen werden [98]. Als kolloiddisperses System zeigen sie *in vivo* ähnlich wie Liposomen (siehe 1.4.2) eine hohe Affinität zu den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES). Durch Adsorption von Tensiden wie Poloxamin 908 oder Polysorbat 80 an die Oberfläche der Nanopartikel kann die Aufnahme in das RES vermindert werden und die Plasmahalbwertszeit erhöht werden [98]. Darüber hinaus konnte mit Polysorbat 80 eine erhöhte Aufnahme in kultivierte Gehirn-Kapillar-Endothelzellen festgestellt werden [24]. Mit dem Enkephalin-analogen Peptid Dalargin beladene Nanopartikel produzierten nach einer Polysorbat 80-Beschichtung eine Analgesie in Mäusen [99]. Der gleiche Effekt liess sich mit Loperamid erzielen, einem Opioid-Rezeptor-Agonisten, der durch seine Impermeabilität an der BHS bei normaler Applikation keine analgetische Wirkung zeigt [6]. Nach Gabe von mit Turbocurarin, einem peripheren Muskelrelaxans, beladenen Polysorbat 80-beschichteten Nanopartikeln beobachtete man auf Epilepsie zurückzuführende Ausschläge im EEG, was ebenfalls auf einen Transport der Nanopartikel durch die BHS hindeutete [7]. Allerdings blieb lange unklar, wie die Nanopartikel in das Gehirn gelangen. In jüngster Zeit gibt es Anzeichen dafür, dass Polysorbat 80 eine Affinität zu einem bestimmten Plasmaprotein, dem Apolipoprotein E, besitzt [116]. Dieses ist Bestandteil von LDL-Partikeln, die an der BHS endozytiert werden. Somit ist denkbar, dass die Nanopartikel durch die Beschichtung mit Polysorbat 80 im Blut Apolipoprotein E adsorbieren und über den LDL-Rezeptor ins Gehirn geschleust werden. Allerdings ist der Teil der Nanopartikel, der das Gehirn erreicht, auch nach der Polysorbat 80-Behandlung im Vergleich zu anderen Organen gering [113].

1.3.6 Chimäre Peptide

Chimäre Peptide sind Konjugate aus einem nicht an der BHS transportierten Peptidarzneistoff und einem Vektor, der den Transport in das Gehirn vermittelt [151]. Als Vektoren dienen dabei Proteine, die an der BHS adsorptiv oder rezeptorvermittelt endozytiert werden. Die Arzneistoffe werden meist kovalent an den Träger gekoppelt. Der Transport des Arzneistoffs erfordert die Endozytose des Konjugats an der Blutseite der BHS, gefolgt von der Exozytose auf der Hirnseite, dem Lösen der Bindung zwischen Vektor und Peptidarzneistoff und dem Binden des Arzneistoffs an seinem Rezeptor im Gehirn [155]. Entscheidend für diese Strategie ist neben der Entdeckung geeigneter Vektoren auch die Kopplung des Arzneistoffs an den Träger unter Erhalt der intrinsischen Aktivität. Als experimentelle Vektoren genutzt wurden bisher Insulin [60], Transferrin [30, 203], der Anti-Insulin Rezeptor Antikörper 83-14 [161], der Anti-Transferrin Rezeptor Antikörper OX26 [21, 30, 56, 57, 58, 208] und kationisiertes Albumin [90, 102, 159]. Einen entsprechenden Vektor vorausgesetzt, ermöglicht diese Strategie ein selektives *drug targeting* zum Gehirn.

1.3.7 Liposomale Konjugate

Ein Nachteil des Prinzips der chimären Peptide ist das Verhältnis von Arzneistoff- zu Trägermolekülen. Bei direkter Kopplung können pro Trägermolekül nur ca. 2 - 10 Arzneistoffmoleküle transportiert werden [21]. Koppelt man dagegen die Trägermoleküle an ein Liposom und belädt dieses mit dem Arzneistoff, kann man abhängig von der Liposomengröße leicht ein Verhältnis von mehr als 10000 Arzneistoffmolekülen pro Trägermolekül erreichen. Liposomen und liposomale Konjugaten als Arzneistoffträger werden im folgenden Kapitel 1.4 vorgestellt.

1.4 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige kolloidale Vesikel, die einen wässrigen Innenraum mit einem oder mehreren Lipidbilayern umschließen. Sie bilden sich oberhalb der kritischen Mizellbildungs-Konzentration spontan, indem sich die lipophilen Molekülteile zueinander organisieren und gleichzeitig die hydrophilen Gruppen auf beiden Seiten die lipophile Schicht gegen das wässrige Medium abschirmen. Schon bald nach der erstmaligen Beschreibung der spontanen Vesikelbildung durch Bangham et al. [15] wurde das Potenzial der Liposomen als Modellsystem zur Untersuchung von Biomembranen [179] und als Arzneistoffträger erkannt. Heute sind folgende Anwendungen für liposomale Arzneistoffe beschrieben:

- als System zur Solubilisierung schlecht wasserlöslicher Substanzen wie Taxol [181] oder lipophiler Cisplatin-Derivate [162]
- zur Erhöhung der Plasmahalbwertszeit von Substanzen, die in der Zirkulation schnell biotransformiert bzw. deaktiviert werden (z.B. Cytosin-arabinosid [124])
- zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen durch eine modifizierte Biodistribution (z.B. verringerte Kardiotoxizität von Doxorubicin [61])
- als System für eine verzögerte Wirkstofffreigabe und eine erhöhte Bioverfügbarkeit [5]
- für ein passives *targeting* von Tumoren und Infektionsherden infolge einer erhöhten Kapillarpermeabilität [209]
- für ein organspezifisches *targeting* durch liposomale Konjugate mit Vektoren, die an bestimmten Epitopen der Zielzellen binden

1.4.1 Aufbau und Herstellung von Liposomen

Liposomen werden nach ihrer Größe und der Anzahl der Lamellen in MLV (multilamellare Vesikel), SUV (kleine unilamellare Vesikel) und LUV (große unilamellare Vesikel) eingeteilt. Die Größen liegen für SUV zwischen 20 nm und 150 nm, für LUV zwischen 150 nm und 10 µm; die Angaben für MLV gehen von 150 nm bis zu 10 µm. Die Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden und Cholesterol.

1.4.1.1 Phospholipide und weitere Membranlipide

Phospholipide als Hauptbestandteil der Liposomen sind Diester des Glycerolphosphates mit verschiedenen Fettsäuren. Die häufigsten natürlichen Fettsäuren sind neben den gesättigten Fettsäuren Myristin- (C_{14}), Palmitin- (C_{16}) und Stearinsäure (C_{18}) die ungesättigten C_{18} -Derivate Ölsäure (18:1 (9)), Linolsäure (18:2 (9,12)) und Linolensäure (18:3 (9,12,15)). Die polare Kopfgruppe besteht aus der Phosphorsäure, die mit Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol oder Inositol verestert sein kann. Die häufigsten Phospholipide in der Natur sind Phosphatidylcholine (PC). Hier und bei den Phosphatidylethanolaminen (PE) bildet die negativ geladene Phosphorsäure mit dem quartären Stickstoff des Cholins bzw. mit dem bei pH 7 positiv geladenen Amin des Ethanolamins ein nach außen hin neutrales Zwitterion. Phosphatidsäuren, Phosphatidylserine, -glycerine und -inositole sind bei neutralem pH negativ geladen. Positiv geladene Lipide kommen in der Natur nicht vor. Als positive Bestandteile von Liposomenmembranen sind u.a. Stearylamin und Salze des N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-Ions beschrieben. Letztere werden vor allem zur Transfektion von RNA und DNA in eukaryotische Zellen eingesetzt.

Phosphatidylcholine werden vor allem aus Sojabohnen und Eidotter isoliert. Die primär heterogenen Gemische mit gesättigten und ungesättigten Fettsäureresten werden meist hydriert, um eine Oxidation während der weiteren Aufarbeitung und Lagerung zu vermeiden. In weiteren Schritten gelangt man zu Fraktionen mit definierten Fettsäure-Zusammensetzungen, die partialsynthetisch zu anderen Phosphatidylderivaten umgesetzt werden können. Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Bio- und Liposomenmembranen ist Cholesterol. Cholesterol selbst bildet keine Bilayer, aber lagert sich in hohen Konzentrationen (bis über 50 % (mol/mol)) in Phospholipid-Bilayer ein.

1.4.1.2 Phasenübergangstemperatur

Die Phasenübergangstemperatur (T_c) der zur Liposomenherstellung verwendeten Lipide und der daraus resultierenden Liposomenmembran hat einen wesentlichen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Membran für eingeschlossene Arzneistoffe. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur befinden sich die Fettsäureketten der Phospholipide in einem geordneten Zustand (Abbildung 1.9).

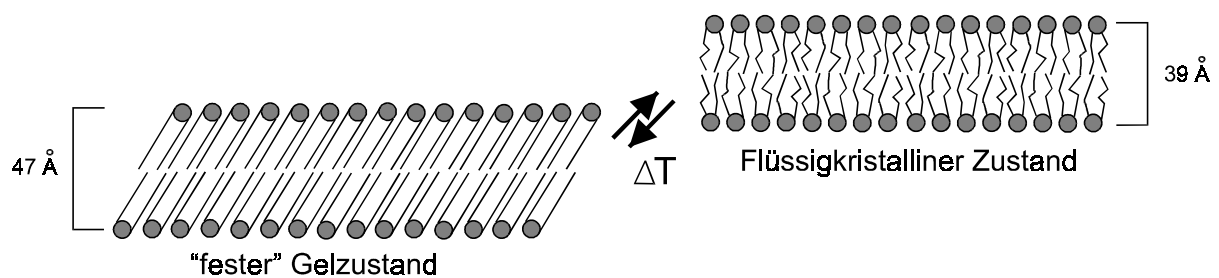


Abbildung 1.9: Phasenübergang eines Phospholipid-Bilayers

In diesem gelartigen Zustand besitzen die Membranlipide nur einen geringen Bewegungsspielraum und schränken die Diffusion eingeschlossener hydrophiler Arzneistoffe stark ein. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur erreichen die Lipidmoleküle einen flüssigkristallinen Zustand, in dem die Fettsäureketten nicht mehr starr angeordnet sind. Mit der Erhöhung der Beweglichkeit verbunden ist eine Reduktion der Dicke des Bilayers um ca 20% [139]. Die Lage der T_c hängt von der Kopfgruppe des Phospholipids und den Fettsäuren ab und kann mit thermoanalytischen Methoden bestimmt werden. Durch Mischen von Phospholipiden können Liposomen mit einer nahezu beliebigen T_c generiert werden. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass das Mischen von Phospholipiden mit stark unterschiedlichen T_c keine einheitliche Phase ergibt [139]. Cholesterol hat nur einen geringen Einfluss auf die Lage der T_c , aber erniedrigt die Energie, die dem System am Phasenübergang zugeführt werden muss. Darüber hinaus bewirkt der Cholesterolzusatz oberhalb der T_c eine Kondensation der Membran, so dass eine höhere Einschlussstabilität erreicht wird. Unterhalb der T_c kann Cholesterol auch destabilisierend wirken, da die Packungsdichte der Phospholipide erniedrigt wird.

1.4.1.3 Herstellung von Liposomen

Multilamellare Liposomen werden meist nach der Filmmethode hergestellt. Hierbei werden die Lipide in organischen Lösungsmitteln gelöst und bilden nach Lösungsmittelentzug einen homogenen Film. Dieser Film wird durch Zugabe einer Pufferlösung und Agitation oberhalb der T_c hydriert und dispergiert. Die so entstandenen MLV sind in Bezug auf ihre Größenverteilung sehr heterogen. MLV mit einer bestimmten Größenverteilung erhält man durch Extrusion der Liposomendispersion durch Membranen definierter Porenweite.

Weitere Methoden zur Generierung kleinerer Vesikel sind Ultraschallbehandlung, Hochdruckdüsenhomogenisation oder *french press*-Extrusion. Mit diesen Methoden können bei Auswahl geeigneter Parameter auch kleine unilamellare Liposomen generiert werden. Große unilamellare Vesikel können durch Fusion aus SUV, *reverse-phase evaporation* oder Lösungsmittelinjektion dargestellt werden. Ausführliche Übersichten über die vielfältigen Methoden der Liposomenherstellung finden sich u.a. in [100, 126, 139].

1.4.1.4 Arzneistoffeinschluss in Liposomen

Die Beladung von Liposomen mit Arzneistoffen erfolgt in Abhängigkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, wie dessen Hydro- bzw. Lipophilie, Ladung oder Molekulargewicht. Ebenfalls von Bedeutung sind die Charakteristika der Liposomen und insbesondere das Herstellungsverfahren. Während der Herstellung z.B. nach der Filmmethode können die Liposomen mit lipophilen und / oder hydrophilen Arzneistoffen beladen werden.

Lipophile Arzneistoffe werden der Lipidlösung im organischen Lösungsmittel zugesetzt. Hierbei lagern sich die Arzneistoffmoleküle in den Lipidbilayer ein. Vermeidet man eine Überladung des Bilayers, können Verkapselungseffizienzen bis zu 100 % erzielt werden.

Hydrophile Arzneistoffe werden in dem zur Hydrierung des Lipidfilms eingesetzten Puffer gelöst. Die Einschlusseffizienz hängt hierbei wesentlich von der Lipidkonzentration und der Liposomengröße ab. Für nach dieser Methode beladene SUV liegt die Einschussrate meist deutlich unter 10 %. Nach der Vesikelgenerierung muss der unverkapselte Arzneistoff abgetrennt werden. Dies kann z.B. durch Zentrifugation, Filtration, Größenausschlusschromatographie oder Dialyse erfolgen. Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden der Aufarbeitung findet sich u.a. in [100, 139].

Kritisch für den Arzneistoffeinschluss bei der Liposomenherstellung ist die Stabilität des Arzneistoffs unter den Herstellungsbedingungen (Temperatur, Druck, Ultraschall) und bei hydrophilen Arzneistoffen der hohe Verlust aufgrund der niedrigen Einschlusseffizienz. Unter bestimmten Voraussetzungen kann dann eine sogenannte aktive Beladungsmethode herangezogen werden: Liposomen können bei niedrigem pH hergestellt werden; anschließend wird der äußere Puffer gegen ein Medium mit neutralem pH getauscht. Lipophile Amine können nun in das Liposomeninnere hinein diffundieren, wo sie aufgrund des niedrigen pH in

eine positiv geladene Form überführt werden und das Liposom nicht mehr verlassen können. Entscheidend ist hierbei die Verwendung von schlecht diffundierenden Ionen (z.B. Glutamat, Zitrat) für den sauren Puffer bei der Herstellung. Diese Beladungsmethode wurde u.a. für Adriamycin beschrieben [122]. Weitere Möglichkeiten der aktiven Beladung finden sich in [121, 123].

Nicht immer besteht die Notwendigkeit des liposomalen Einschlusses. So bilden negativ geladene DNA-Stränge mit positiv geladenen Liposomen Komplexe; diese werden durch Fusion der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen [109]. Auch können Proteine wie der Tumor-Nekrose-Faktor an die Liposomenmembran adsorbieren [36].

1.4.2 *In vivo* Verteilung von Liposomen

Die Untersuchung der Verteilung von Liposomen im Organismus ist für die Anwendung als System zur modifizierten Wirkstofffreigabe oder zum zielgesteuerten Arzneistofftransport (*drug targeting*) essenziell. Das Verhalten der Liposomen im Organismus hängt dabei wesentlich von der Vesikelgröße und den Oberflächeneigenschaften ab. Im Allgemeinen werden große Liposomen nach intravenöser Applikation schnell (Plasmahalbwertszeit im Bereich weniger Minuten) von den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) aus der Zirkulation entfernt und erreichen so kaum andere Zellen als die stationären Makrophagen der Leber und der Milz. Kleine Liposomen mit einem Durchmesser von 150 nm oder darunter gelangen nicht so schnell in das RES und können sich durch das fenestrierte Kapillarendothel auch in anderen peripheren Geweben anreichern.

Koppelt man dagegen Antikörper für ein gezieltes *drug targeting* an die kleinen Liposomen, nimmt die Erkennung durch das RES stark zu und die Zielzellen werden kaum erreicht [41, 175]. Ein Fortschritt in der Erhöhung der Plasmahalbwertszeit von normalen und vektorgekoppelten Liposomen konnte durch „sterische Stabilisierung“ erzielt werden. Hierbei wird die Liposomenoberfläche mit hydrophilen Polymeren, meist Polyethylenglykol, maskiert, indem zur Liposomenherstellung Lipidderivate dieser Polymere eingesetzt werden [106]. Häufig wird ein Konjugat aus (Methyl-)Polyethylenglykol und Distearoyl-Phosphatidylethanolamin (DSPE-MPEG) in Konzentrationen bis zu 5 % (mol/mol) verwendet (Abbildung 1.10).

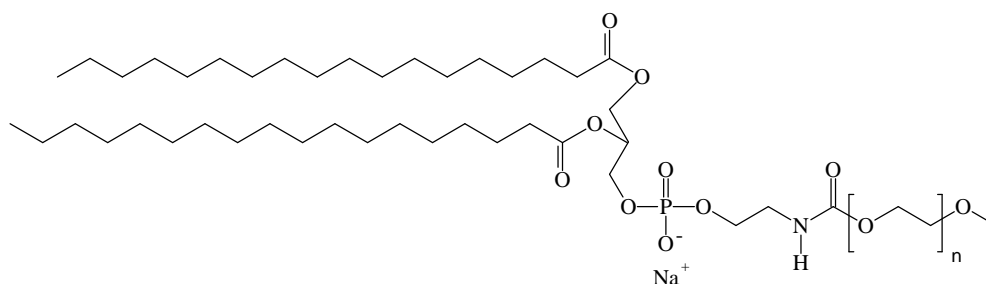


Abbildung 1.10: DSPE-MPEG

Diese lang zirkulierenden Liposomen weisen eine dosisunabhängige Pharmakokinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit im Bereich von mehreren Stunden auf [5]. Die Plasmahalbwertszeit und das Ausmaß der RES-Aufnahme sind von der Kettenlänge des PEG abhängig. Ein Molekulargewicht von 2000 Da (PEG₂₀₀₀) führt zu einer maximalen Halbwertszeit und zu einer minimalen RES-Aufnahme [207].

1.4.3 Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen

Die Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Zellen hängen vom Zelltyp und den Eigenschaften der Liposomen ab [17]. Phagozytierende Zellen, wie die stationären Makrophagen des RES, nehmen Liposomen hauptsächlich durch Phagozytose (siehe 1.1.3.4) auf. Als Wechselwirkungen zwischen nicht-phagozytierenden Zellen und Liposomen sind Adsorption bzw. Bindung an die Zelloberfläche, Fusion, Endozytose und Lipid austausch beschrieben. Die einzelnen Möglichkeiten der Interaktion schließen sich nicht gegenseitig aus; oft werden Kombinationen beobachtet. Ausführliche Übersichten hierzu finden sich u.a. in [20, 101, 147].

Die Adsorption bzw. Bindung an die Zelloberfläche kann sowohl die Vorstufe für weitere Wechselwirkungsmechanismen als auch ein eigenständiger Prozess sein. Als Ursachen kommen physikalische Anziehungskräfte (z.B. elektrostatische Wechselwirkungen) als auch Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in Betracht.

Bei der Fusion verbindet sich die Lipidmembran der Liposomen mit der Zytoplasmamembran der Zellen, wobei der liposomale Inhalt in das Zytosol abgegeben wird. Die Fusion ist vom Energiestoffwechsel der Zelle unabhängig und tritt bevorzugt oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Liposomen auf.

Bei der energieabhängigen Aufnahme durch Endozytose werden die Liposomen in intrazelluläre Vesikel dirigiert (siehe 1.1.3.4.5). Den Transfer von liposomalen Membranbestandteilen zur Zellmembran ohne Übergang des liposomalen Inhalts bezeichnet man als Lipid austausch. Dieser Übergang erfordert einen physikalischen Kontakt und ist von der Phospholipid-Kopfgruppe abhängig.

Ziel eines *drug targetings* mit Liposomen ist meist die zelluläre Aufnahme des liposomalen Arzneistoffes in die Zielzellen, z.B. Tumorzellen. Bei speziellen Anwendungen, z.B. der Radiotherapie mit liposomal verkapselten α -Strahlern, reicht schon eine stabile Bindung an die Zielzellen, um eine Wirkung zu erzielen. Im Falle des *drug targetings* zum Gehirn ist eine direkte Aufnahme in die Neuronen aufgrund der Präsenz der BHS nicht möglich; hier ist eine Transzytose des liposomalen Arzneistoffes durch die Endothelzellschicht erforderlich (siehe 1.3.6 und 1.3.7).

1.4.4 Liposomale Konjugate für ein spezifisches *drug targeting*

Für einen zellspezifischen Arzneistofftransport müssen Liposomen an geeignete Vektoren gekoppelt werden. Als Vektoren werden meist Antikörper oder andere Proteine, aber auch niedermolekulare Substanzen wie z.B. Folsäure, verwendet. Die Kopplung an präformulierte Liposomen kann durch kovalente und nicht-kovalente Methoden erfolgen. Bei lang zirkulierenden Liposomen kann weiterhin zwischen einer Kopplung direkt am Lipidbilayer (Abbildung 1.11 B) und am Ende der PEG-Ketten (Abbildung 1.11 C) unterschieden werden.

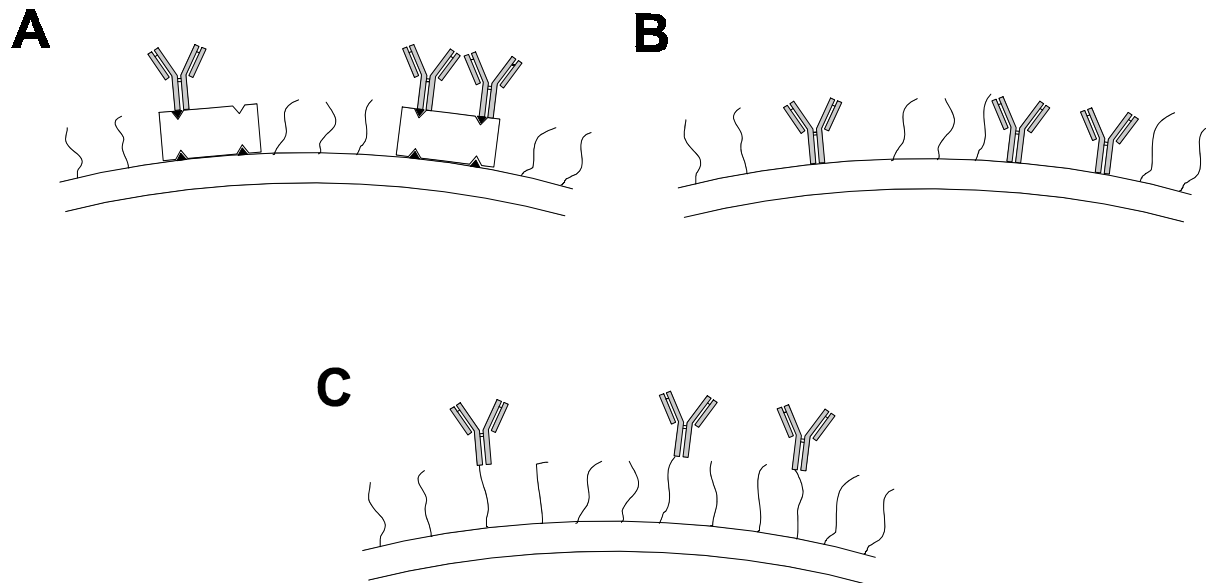


Abbildung 1.11: Kopplung von Proteinen an PEG-Liposomen. **A:** Avidin-Biotin Methode; **B:** kovalente Kopplung an eine Phospholipid-Kopfgruppe; **C:** Kopplung an den PEG-Terminus (aus [3])

1.4.4.1 Nicht-kovalente Kopplungsmethoden

Neben der adsorptiven Bindung (vgl. 1.4.1.4) ist vor allem die Avidin-Biotin Methode von Bedeutung (Abbildung 1.11 A) [114, 115, 183, 199]. Hier wird die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin ausgenutzt; beide Proteine besitzen vier Bindungsstellen für Biotin. Zur Herstellung von Immunglobulin-konjugierten Liposomen werden Liposomen, die ein biotinyliertes Phospholipid (z.B. Biotin-PE) enthalten, mit Avidin versetzt. Das Avidin bildet einen Komplex mit dem liposomalen Biotin. Anschließend können biotinylierte Immunglobuline an das Avidin gebunden werden. Durch die vier Bindungsstellen des Avidins können bei dieser Methode auch Aggregate aus biotinylierten Liposomen entstehen. Verwendet man die Avidin-Biotin Technologie zur Kopplung an PEG₂₀₀₀-DSPE enthaltende Liposomen, sinkt die Bindungseffizienz auf 20 - 33 % in Relation zu Liposomen ohne PEG [3].

1.4.4.2 Kovalente Kopplungsmethoden

Die kovalente Kopplung von Proteinen an Liposomen begann in den 70er Jahren mit Carbodiimid-Derivaten [50]. Diese Verbindungen aktivieren Carboxylfunktionen, so dass diese mit nukleophilen Gruppen, wie z.B. der primären Aminogruppe im PE, reagieren können. Die Kopplungseffizienz blieb allerdings gering. Weitere Probleme der Kopplung mit Carbodiimiden sind die geringe Spezifität der Reaktion sowie die Toxizität der Carbodiimid-Derivate.

In der Folge verwendete man modifizierte Phospholipidderivate zur kovalenten Kopplung, darunter das Maleimidophenylbutyrat-PE (MPB-PE) [118] und das N-Pyridyldithiopropionyl-PE (PDP-PE) [119]. Beide Lipidderivate reagieren in neutralem Milieu mit ähnlichen Kopplungseffizienzen mit Thiolen; MPB-PE unter Bildung eines Thioethers (Abbildung 1.12 A) und PDP-PE unter Bildung eines Disulfides (Abbildung 1.12 B). Die Thioetherbindung hat gegenüber der Disulfidbrücke den Vorteil, stabiler zu sein [118].

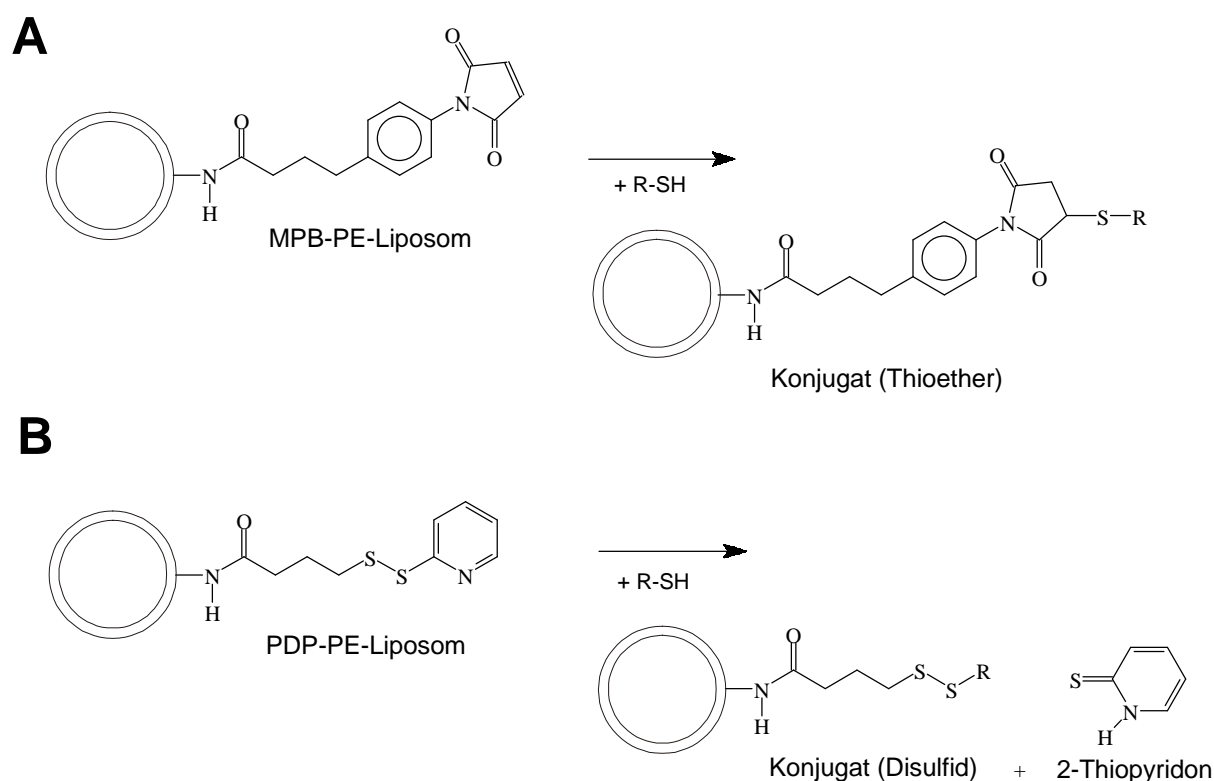


Abbildung 1.12: Kovalente Kopplung von Thiolen an Liposomen mit kopfgruppen-modifiziertem PE. **A:** MPB-PE; **B:** PDP-PE

Die auf der Proteinseite benötigten Sulfhydryl-Gruppen können aus freien Cysteinresten des Proteins stammen oder durch chemische Modifikation in das Protein eingeführt werden.

Auch bei Proteinen, die über freie Cysteinreste verfügen, kann eine chemische Modifikation erforderlich sein, wenn sich das betreffende Cystein im Molekülinneren befindet und somit eine Kopplung nicht oder nur in sehr geringen Ausbeuten möglich ist. Für das Einführen von Sulfhydrylgruppen in Proteine existiert eine Reihe von Methoden. Im Folgenden werden die Reagenzien 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz), SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio-)propionat) und SATA (N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat) verglichen (Abbildung 1.13).

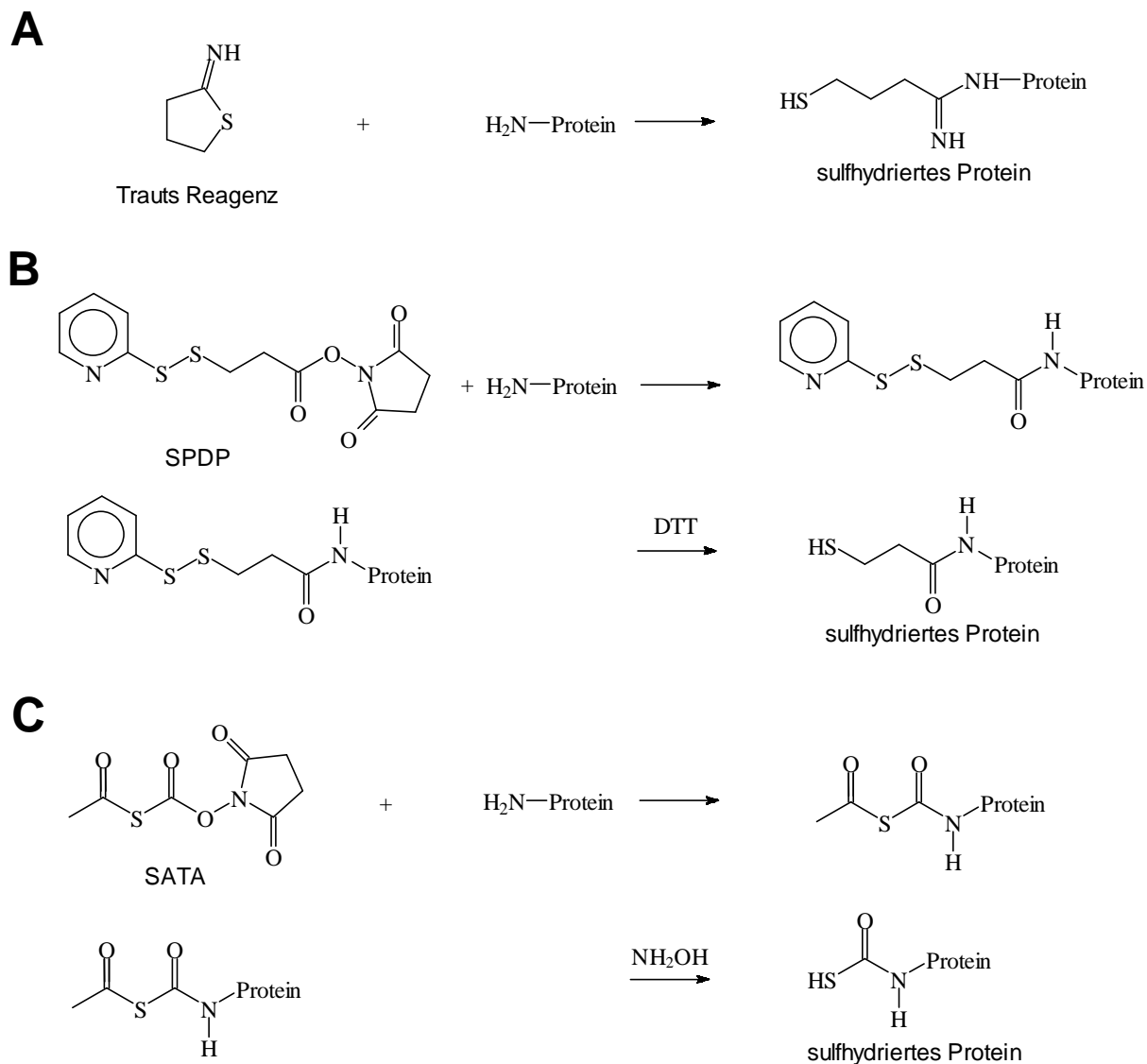


Abbildung 1.13: Sulfhydrierung von Proteinen. **A:** Trauts Reagenz; **B:** SPDP; **C:** SATA

Die Modifikation von Proteinen mit Trauts Reagenz liefert in einem Reaktionsschritt das sulfhydrierte Produkt (Abbildung 1.13 A). Die Reaktion bei einem pH von 7 - 10 verläuft langsam und ist schlecht zu steuern, was eine Optimierung der Reaktionsbedingungen erfordert [125]. Zudem kann das Reaktionsprodukt aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit nicht gelagert werden. Ein Vorteil der Verwendung von Trauts Reagenz ist die geringe Beeinflussung der biologischen Aktivität des Proteins [71].

Die Reaktion von primären Aminen mit SPDP erfolgt in neutralem bis leicht alkalischem Milieu sehr schnell (Abbildung 1.13 B) [32]. Das primär entstehende Produkt ist durch die Disulfid-Schutzgruppe lagerfähig und wird unmittelbar vor der Kopplung durch Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) in die Sulfhydrylform überführt. Die Extinktion des hierbei entstehenden 2-Thiopyridons kann direkt zur Bestimmung der eingeführten SH-Funktionen dienen. Von Nachteil ist die nötige Entfernung des überschüssigen DTT vor der Kopplung an das Liposom, da es als Thiol ebenfalls an die Liposomen binden kann.

Diesen Nachteil weist die Modifikation durch SATA (Abbildung 1.13 C) nicht auf [49]. Die Schutzgruppe des bei der Reaktion entstehenden Produktes wird mit Hydroxylamin abgespalten, das zur Kopplung nicht entfernt werden muss. Die Zahl der eingeführten SH-Gruppen kann hier mit der Methode nach Ellman [54, 77, 177] bestimmt werden.

Die beschriebenen Methoden der Kopplung an die Kopfgruppen modifizierter Phospholipide wurden auch für lang zirkulierende PEG-Liposomen angewendet. Die hierbei beobachteten Kopplungseffizienzen lagen ähnlich wie bei der Avidin-Biotin Methode (1.4.4.1) weit unter denen für konventionelle Liposomen [3]. Ebenso reduzierte sich die Zellbindung durch die PEG-Ketten in Abhängigkeit von der PEG-Kettenlänge [133]. Um diese Problematik zu umgehen, wurden in jüngster Zeit mehrere Methoden zur kovalenten Kopplung an den PEG-Terminus lang zirkulierender Liposomen entwickelt. Zuerst wurde ein Hydrazid-Derivat von PEG-PE beschrieben [73, 211]. Hierbei erfolgt die Kopplung von Proteinen nach Oxidation bestimmter Aminosäurereste zu Aldehyden unter Bildung eines Hydrazons.

Die Kopplung mit den darauf entwickelten PDP-PEG-PE [4, 59, 73, 127] und den Maleimid (MI)-Derivaten MI-PEG-PE [59, 86, 120, 180, 186] sowie MI-PEG-Cholesterol [94] verläuft analog zu der oben beschriebenen Kopplung von Thiolen an PDP-PE bzw. MPB-PE. Die beschriebenen MI-PEG-PE unterscheiden sich bedingt durch unterschiedliche Synthesen hinsichtlich ihrer Struktur. Ein weiteres thiolreaktives PEG-Lipid ist das Bromoacetylamo-PEG-PE [59]. Die Carbodiimid-Methode wurde zur Kopplung von Folsäure an Amino-PEG-PE genutzt [62]; eine weitere Methode zur Kopplung von Folsäure an Amino-PEG-PE führte über den N-Hydroxy-succinimid-Ester der Folsäure [111]. Die jüngste beschriebene Methode stellt die Verwendung von Cyanur-PEG-PE [19] dar. Hierbei wird das Protein durch nukleophile Substitution ohne eine vorhergehende Derivatisierung an das Liposom gebunden.

1.4.5 Charakterisierung von Liposomen und liposomalen Konjugaten

Die Charakterisierung von Liposomen erfolgt im Wesentlichen über die Partikelgrößenverteilung und die Bestimmung der Menge an eingeschlossenem Arzneistoff. Die Bestimmung der Liposomengröße ist durch laseroptische Verfahren, insbesondere der Photonenkorrelationsspektroskopie, einfach und schnell durchzuführen.

Die Bestimmung der eingeschlossenen Arzneistoffmenge erfordert zumeist eine Zerstörung der liposomalen Struktur; anschließend wird der Arzneistoffgehalt mit den üblichen Analysemethoden bestimmt. Eine gängige Angabe der Menge des eingeschlossenen hydrophilen Arzneistoffs erfolgt in $1 \times \text{mol}^{-1}$ (eingeschlossenes Volumen der Arzneistofflösung bei der Liposomenherstellung pro Stoffmenge Lipid). Dieses Maß ist von der Liposomengröße und der Lamellarität abhängig.

Bei liposomalen Konjugaten stellt die gebundene Menge an Protein einen wichtigen Parameter dar. Der Proteingehalt lässt sich mit den verschiedenen beschriebenen Proteinassays [26163, 164] oder durch eine proteinspezifische Analytik bestimmen. Die Angabe erfolgt meist in $\mu\text{g} \times \mu\text{mol}^{-1}$ (Masse Protein pro Stoffmenge Lipid). Durch die Umrechnung auf die Anzahl von Proteinmolekülen pro Liposom gelangt man zu einem anschaulicheren Wert. Bei der Untersuchung der Lagerstabilität liposomaler Zubereitungen kann die Liposomengröße ohne weitere Aufarbeitung bestimmt werden. Die Bestimmung des Arzneistoff- und des Proteingehaltes erfordert dagegen zumeist eine Abtrennung der Liposomen vom umgebenden Medium, um abgespaltene oder freigesetzte Moleküle nicht zu erfassen.

1.4.6 Untersuchung der Wechselwirkung von liposomalen Konjugaten mit Zellen

Um den therapeutischen Nutzen von liposomalen Konjugaten abschätzen zu können, muss zunächst die Interaktion mit den Zielzellen untersucht werden. Eine gängige, sehr empfindliche und vielseitige Methode zur Untersuchung dieser Wechselwirkungen stellt die Fluorimetrie dar; die Anwendung bedingt den liposomalen Einschluss eines Fluoreszenzmarkers. Zur Verfügung stehen sowohl hydrophile Marker, wie 5(6)-Carboxyfluoreszein (CF) [20, 101], Calcein [180] oder Pyranin [185], als auch fluoreszierende Phospholipidderivate (z.B. Rhodamin-PE).

Die „klassische“ fluorimetrische Untersuchung kann mit Küvettenfluorimetern oder Fluoreszenzlesegeräten für Zellkulturplatten erfolgen. In der Cytofluorimetrie kann die Fluoreszenz einer Vielzahl einzelner Objekte (z.B. Zellen) im Durchfluss erfasst werden [20]. Eine Visualisierung der Wechselwirkung zwischen Liposomen und Zellen ist durch die Fluoreszenz-Mikroskopie möglich. Die konfokale Lasermikroskopie erlaubt eine dreidimensionale Darstellung des Fluoreszenzbildes. Vor allem mit letzterer Methode ist die sonst problematische Differenzierung zwischen Zellbindung und zellulärer Aufnahme möglich.

1.4.7 Liposomale Konjugate für ein *drug targeting* zum Gehirn

Im Gegensatz zum *drug targeting* zum Gehirn mit chimären Peptiden (siehe 1.3.6) finden sich in der Literatur nur wenige Ansätze, Liposomen für einen gezielten Arzneistofftransport in das zentrale Nervensystem zu nutzen.

Kobayashi et al. [96] verglichen die Aufnahme ins Gehirn von einer 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin-Lösung (THA) mit zwei nicht-vektorgekoppelten liposomalen Formulierungen. Mit 3 µm großen Liposomen wurde 60 min. nach der Injektion eine dreifach höhere Konzentration im Vergleich zum freien Arzneistoff gefunden; mit SUV (150 nm Durchmesser) ergab sich allerdings nur eine Konzentration von 50 % der THA-Lösung. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor schon von Schackert et al. [174] berichtet. Es scheint wahrscheinlich, dass die höhere gemessene Akkumulation grosser MLV im ZNS nur auf die Retention in Kapillaren zurückzuführen ist.

Micklus et al. [128] koppelten kationisiertes Albumin an konventionelle Liposomen und konnten keine erhöhte Aufnahme dieses Konjugates an der BHS feststellen, obwohl kationisiertes Albumin zuvor als Vektor in chimären Peptiden eingesetzt werden konnte (siehe 1.3.6). Den einzigen erfolgversprechenden Ansatz liefern die aktuellen Arbeiten von Huwyler et al. [83, 84, 86]. Hier wurde der Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper OX26 an das PEG-terminale Ende lang zirkulierender SUV-Liposomen gekoppelt. Mit diesem Konjugat liess sich ein Targeting zu dem an der BHS vorkommenden Transferrin-Rezeptor erzielen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es, ein liposomales Konjugat mit einem für das *drug targeting* zum Gehirn geeigneten Vektor herzustellen, dieses zu charakterisieren und seine Wechselwirkungen mit der Blut-Hirn Schranke in geeigneten Modellen zu untersuchen.

Ein besonderer Schwerpunkt sollte hierbei die Etablierung eines *in vitro*-Modells aus primären Kapillar-Endothelzellen aus Schweinehirn sein. Für diese Etablierung wurde vorgesehen,

- BCECs nach einem in der Literatur beschriebenen Verfahren zu isolieren und zu kultivieren,
- charakteristische Markerproteine und –enzyme nachzuweisen,
- den Versuch einer Optimierung der Kulturbedingungen (z.B. durch Astrozyten-konditioniertes Medium) zu unternehmen und
- die Eignung als prediktives Modell für den Transport von Arzneistoffen an der BHS *in vivo* zu untersuchen.

Als Vektor für das liposomale Konjugat wurde kationisiertes Albumin ausgewählt, welches in die Blut-Hirn Schranke aufgenommen werden soll. Die Liposomen sollten im Hinblick auf eine spätere *in vivo*-Prüfung eine PEG-Komponente enthalten und kovalent mit dem kationisierten Albumin gekoppelt werden. Die Kopplung sollte dabei an das PEG-terminale Ende erfolgen. Da die Untersuchung der Wechselwirkungen mit den BCECs vorwiegend mit fluorimetrischen Methoden erfolgen sollte, waren Fluoreszenzmarker in die Liposomen zu integrieren.

Schließlich sollte untersucht werden, ob ein solches liposomales Konjugat an die Endothelzellen der BHS bindet und in diese aufgenommen wird. Des Weiteren sollte der Mechanismus der eventuellen Aufnahme charakterisiert und überprüft werden, ob der liposomale Inhalt die Zellen durchqueren, also in das Gehirn gelangen kann.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Substanzen

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Chemikalien und Reagenzien verwendet. Tabelle 2.2 listet alle Medien und Puffer zur Zellkultivierung, die verwendeten Hydratations- und Dispersionsmittel zur Liposomenherstellung sowie alle übrigen selbst hergestellten Lösungen auf.

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien

Bez.	Substanz	Qualität	Hersteller
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_5$	Ammoniumpersulfat	für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
Acrylamid		für Elektrophorese	Biorad, München (D)
Ameisensäure		p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Ampholyte 3/10		für Elektrophorese	Biorad, München (D)
Amphotericin B	Amphotericin B, solubilisiert	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Anti-Kaninchen-FITC	Antikörper gegen Kaninchen IgG – FITC-Konjugat	Immunfluoreszenz	Sigma, Deisenhofen (D)
Anti-Maus-FITC	Antikörper gegen Maus IgG – FITC-Konjugat	Immunfluoreszenz	Roche, Mannheim (D)
Anti-Vimentin	Antikörper (entwickelt in der Maus) gegen Vimentin	Immunfluoreszenz	Sigma, Deisenhofen (D)
Anti-vWF	Antikörper (entwickelt im Kaninchen) gegen von Willebrand-Faktor	Immunfluoreszenz	Sigma, Deisenhofen (D)
Ara-C	Cytosin-arabinofuranosid		Sigma, Deisenhofen (D)
Bisacrylamid		für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
Brilliant Blau R 250		für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
Bromphenolblau		p.a.	Schmid, Köngen (D)
BSA	Rinder-Serumalbumin	für Immunoassay	Fluka, Neu-Ulm (D)
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Calciumchlorid-dihydrat	p.a.	Riedel de Haen, Seelze (D)
CH_3COOH	Essigsäure	p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Chloroform		p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Collagen	Collagen aus Rattenschwanz	steril	Roche, Mannheim (D)
Collagenase/Dispase		steril	Roche, Mannheim (D)
CPT-cAMP	4-Chlorophenylthio-cAMP		Sigma, Deisenhofen (D)
Crocein Scarlet		für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	Kupfer-(II)-sulfat-pentahydrat	p.a.	Riedel de Haen, Seelze (D)
Dansylcadaverin			Sigma, Deisenhofen (D)
Dextran	Dextran, durchschnittliches Molekulargewicht 80.000	klinische Qualität	Sigma, Deisenhofen (D)

Bez.	Substanz	Qualität	Hersteller
Dispase	Dispase II		Roche, Mannheim (D)
DMSO	Dimethylsulfoxid	p. a.	J.T. Baker, Deventer (NL)
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)		Sigma, Deisenhofen (D)
EDAC	1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid-hydrochlorid		Sigma, Deisenhofen (D)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Essigsäure		p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Ethylendiamin	Ethylendiamin-dihydrochlorid	p. a.	Sigma, Deisenhofen (D)
F-12 Ham	Nutrient Mixture F 12 Ham	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
FD-10	Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 10000		Sigma, Deisenhofen (D)
FD-20	Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 20000		Sigma, Deisenhofen (D)
FD-4	Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 4000		Sigma, Deisenhofen (D)
FD-40	Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 40000		Sigma, Deisenhofen (D)
FD-70	Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 70000		Sigma, Deisenhofen (D)
Fibronectin		aus Humanplasma	Becton Dickinson, Heidelberg (D)
Filipin	Filipin-Komplex		Sigma, Deisenhofen (D)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat		Sigma, Deisenhofen (D)
FITC-Albumin	Fluoreszeinisothiocyanat-Rinder-Serumalbumin		Fluka, Neu-Ulm (D)
FKS	Fetales Kälberserum		Gibco, Karlsruhe (D)
Glucose	D(+)-Glucose	für Biochemie	Merck, Darmstadt (D)
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd 25%	p. a.	Merck, Darmstadt (D)
Glycerin	Glycerin 85%	Ph. Eur.	Theoretikum, Heidelberg (D)
Glycin		p. a.	Roth, Karlsruhe (D)
Gly-Gly	L-Glycyl-L-glycin	p. a.	Sigma, Deisenhofen (D)
Heparin	Heparin, Na-Salz	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	Pufferqualität	Applichem, Darmstadt (D)
Hydrocortison		p. a.	Sigma, Deisenhofen (D)
IEF-Standard	Protein-Standards für isoelektrische Fokussierung		Biorad, München (D)
Isobutanol		p. a.	Theoretikum, Heidelberg (D)
Isopropylalkohol		p. a.	Theoretikum, Heidelberg (D)
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat	p.a.	Merck, Darmstadt (D)
KCl	Kaliumchlorid	p.a.	Ferak, Berlin (D)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Gerbu, Gaiberg (D)
L-γ-Glu-nitroanilid	L-γ-Glutamyl-p-nitroanilid	p. a.	Sigma, Deisenhofen (D)

Bez.	Substanz	Qualität	Hersteller
MEM Eagle	Minimal Essential Medium Eagle	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Mercaptoethanol		für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
Methanol		p. a.	Theoretikum, Heidelberg (D)
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-hexahydrat	p.a	J.T. Baker, Deventer (NL)
MPR 2	enzymatischer Farbstest Phospholipide		Roche, Mannheim (D)
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	p.a.	Riedel de Haen, Seelze (D)
NaCl	Natriumchlorid	p.a	J.T. Baker, Deventer (NL)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Nocodazol			Sigma, Deisenhofen (D)
Paraformaldehyd		p.a.	Merck, Darmstadt (D)
Penicillin	Penicillin-G, Natriumsalz	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Percoll	Percoll	steril	Pharmacia Biotech, Freiburg (D)
Percoll-Standard	Dichte-Standards für Percollgradienten		Pharmacia Biotech, Freiburg (D)
Pferdeserum		aus Spenderpool	Gibco, Karlsruhe (D)
Phenylarsinoxid			Sigma, Deisenhofen (D)
Poly-D-Lysin	Poly-D-Lysin-hydrobromid	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Polymyxin B	Polymyxin-B-sulfat	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
Propidiumiodid			Sigma, Deisenhofen (D)
Protein-Assay II	Reagenz für Proteinbestimmung nach Bradford		Biorad, München (D)
Riboflavin		p. a.	Sigma, Deisenhofen (D)
RO-20-1724	Phosphodiesterasehemmer		Biomol, Hamburg (D)
Salicylsäure		reinst Ph. Eur.	Theoretikum, Heidelberg (D)
Salicylsäure-Glucosid			DKFZ, Heidelberg (D)
SATA	N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat	für Synthese	Sandoz, Basel (CH)
SDS	Natrium-dodecylsulfat		Sigma, Deisenhofen (D)
SDS-Standard	Protein-Standards für SDS-Gelelektrophorese	low molecular weight	Pharmacia Biotech, Freiburg (D)
SFM	Serumfreies Medium	für Endothelzellen	Gibco, Karlsruhe (D)
Streptomycin	Streptomycinsulfat	für Zellkultur	Sigma, Deisenhofen (D)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	für Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen (D)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Pufferqualität	Sigma, Deisenhofen (D)
Triton® X-100			Merck, Darmstadt (D)
Trypsin-EDTA	0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA in HBSS (Ca-/Mg-frei)		Gibco, Karlsruhe (D)
Vectashield®	Eindeckmedium für Fluoreszenzmikroskopie		Linaris, Wertheim-Bettingen (D)
Wasser	bidestilliertes Wasser		hauseigene Destille

Tabelle 2.2: Medien und Pufferlösungen

Bezeichnung	Abk.	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung für Elektrophorese	Lsg. N	Acrylamid 29,2 g
		Bisacrylamid 0,8 g
		Wasser ad 100 ml
Anzuchtmedium für Kapillar-Endothelzellen pH 7,4	AZM	EM 40 ml
		Amphotericin B (10 mg/ml) 10 µl
Bromphenolblau 1 %		Bromphenolblau 1 g
		Wasser ad 100 ml
Dextran-Lösung 13 % pH 7,4	Dextran	MEM Eagle 4,8 g
		HEPES 5,95 g
		Polymyxin B 0,025 g
		Streptomycinsulfat 0,05 g
		Penicillin-Natrium 0,05 g
		Dextran 65 g
		Wasser ¹ ad 500 ml
Einfriermedium für Kapillar-Endothelzellen pH 7,4		MEM Eagle 1,68 g
		F-12 Ham 1,63 g
		NaHCO ₃ 0,43 g
		HEPES 1,85 g
		Streptomycinsulfat 0,05 g
		Penicillin-Natrium 0,05 g
		Heparin 0,05 g
		Wasser ¹ ad 350 ml
		Pferdeserum 100 ml
Entfärbelösung I IEF-Gel		DMSO 50 ml
		CuSO ₄ 5 g
		Isopropylalkohol 120 g
		Essigsäure 70 g
Entfärbelösung II IEF-Gel		Wasser ad 1000 ml
		Isopropylalkohol 250 g
		Essigsäure 70 g
Entfärbelösung SDS-Gel		Wasser ad 1000 ml
		Methanol 400 g
Essigsäure 3 N		Wasser ad 100 ml
		Essigsäure 18 g

¹ zunächst in ca. 90% der Wassermenge lösen; pH mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf den angegebenen Wert einstellen; mit Wasser auf angegebenes Volumen auffüllen; ggf. durch 0,22 µm Membranfilter in autoklavierte Flasche filtrieren; ggf. nachstehende Substanzen zugeben

Bezeichnung	Abk.	Zusammensetzung		
Färbelösung IEF-Gel		Brilliant Blau R 250	0,4	g
		Crocein Scarlet	0,5	g
		CuSO ₄	5	g
		Isopropylalkohol	270	g
		Essigsäure	100	g
		Wasser	ad	1000 ml
Färbelösung SDS-Gel		Brilliant Blau R 250	1	g
		Methanol	400	g
		Essigsäure	100	g
		Wasser	ad	1000 ml
<i>Hank's balanced salt solution</i> pH 7,4	HBSS	NaCl	8,0	g
		KCl	0,4	g
		KH ₂ PO ₄	0,06	g
		NaHPO ₄	0,05	g
		Glucose	1,0	g
		MgCl ₂ × 6 H ₂ O ²	0,25	g
		CaCl ₂ × 2 H ₂ O ³	0,21	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
<i>Hank's balanced salt solution</i> pH 7,4; Ca ²⁺ -, Mg ²⁺ -frei	HBSS Ca-/Mg-frei	NaCl	8,0	g
		KCl	0,4	g
		KH ₂ PO ₄	0,06	g
		NaHPO ₄	0,05	g
		Glucose	1,0	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
HEPES-EDTA-Puffer pH 7,4		HEPES	2,40	g
		NaCl	8,40	g
		EDTA	0,75	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
Minimal Essential Medium pH 7,4	MEM	MEM Eagle	9,6	g
		NaHCO ₃	2,2	g
		HEPES	11,9	g
		Polymyxin B	0,05	g
		Streptomycinsulfat	0,1	g
		Penicillin-Natrium	0,1	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
		Amphotericin B (10 mg/ml; steril)	250	µl
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %		SDS	10	g
		Wasser	ad	100 ml

² erst nach dem Einstellen des pH-Wertes zugeben³ erst nach dem Mg-Salz zugeben

Bezeichnung	Abk.	Zusammensetzung	
Percoll-Lösung 50 % pH 7,4	Percoll	MEM Eagle	1,92 g
		HEPES	2,38 g
		Polymyxin B	0,01 g
		Streptomycinsulfat	0,02 g
		Penicillin-Natrium	0,02 g
		Wasser ¹	ad 100 ml
		Percoll	100 ml
Phosphatpuffer pH 7,4	PBS	NaCl	8,00 g
		KCl	0,20 g
		Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	1,44 g
		KH ₂ PO ₄	0,20 g
		Wasser ¹	ad 1000 ml
Proben-Puffer für SDS-Elektrophorese		10 % SDS	2,00 ml
		Glycerin	1,00 ml
		2-Mercaptoethanol	0,50 ml
		1 % Bromphenolblau	0,50 ml
		Lsg. M	1,25 ml
		Wasser	4,75 ml
Puffer A für die Kapillar-Isolierung		NaHCO ₃	2,10 g
		Glucose	1,80 g
		Na-Pyruvat	0,11 g
		BSA	5,00 g
		Puffer B	ad 1000 ml
Puffer B für die Kapillar-Isolierung		NaCl	12,00 g
		KCl	0,70 g
		KH ₂ PO ₄	0,33 g
		HEPES	7,15 g
		MgSO ₄ × 7 H ₂ O ²	0,59 g
		CaCl ₂ × 2 H ₂ O ³	0,74 g
		Wasser ¹	ad 2000 ml
Puffer für SDS-Elektrophorese-Kammer	Lsg. Q	TRIS	3,03 g
		Glycin	14,40 g
		SDS	1,00 g
		Wasser	ad 1000 ml
Puffer pH 6,8 für SDS-Elektrophorese-Gel	Lsg. M	TRIS	6,06 g
		SDS	0,40 g
		Wasser ¹	ad 100 ml
Puffer pH 8		Na ₂ HPO ₄	17,8 g
		Wasser ¹	ad 1000 ml
Puffer pH 8,8 für SDS-Elektrophorese-Gel	Lsg. L	TRIS	18,17 g
		SDS	0,40 g
		Wasser ¹	ad 100 ml

Bezeichnung	Abk.	Zusammensetzung		
Reaktionsgemisch für GGT-Aktivitätsbestimmung pH 9,0	GGT	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,405	g
		Glycylglycin	0,530	g
		L-γ-Glu-nitroanilid	0,150	g
		TRIS	7,3	g
		Wasser ¹	ad	100 ml
Saurer Waschpuffer pH 3	SP	NaCl	7,0	g
		Barbital-Natrium	4,1	g
		Natriumacetat × 3 H ₂ O	3,8	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
Transportpuffer pH 7,4	TP	NaCl	8,3	g
		KCl	0,23	g
		K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	0,34	g
		HEPES	2,4	g
		D-Glucose	0,72	g
		MgCl ₂ × 6 H ₂ O ²	0,25	g
		CaCl ₂ × 2 H ₂ O ³	0,21	g
		Wasser ¹	ad	1000 ml
Trypsin-EDTA		Trypsin	2,5	g
		EDTA	0,38	g
		HBSS, Ca/Mg-frei	ad	1000 ml
Zellkulturmedium für Astrozyten pH 7,4	AM	MEM Eagle	4,8	g
		NaHCO ₃	0,55	g
		HEPES	2,38	g
		D-Glucose	2,98	g
		Streptomycinsulfat	0,05	g
		Penicillin-Natrium	0,05	g
		Heparin	0,05	g
		Wasser ¹	ad	450 ml
		FKS		50 ml
Zellkulturmedium für Kapillar-Endothelzellen pH 7,4	EM	MEM Eagle	2,16	g
		F-12 Ham	2,41	g
		NaHCO ₃	0,55	g
		HEPES	2,38	g
		Streptomycinsulfat	0,05	g
		Penicillin-Natrium	0,05	g
		Heparin	0,05	g
		Wasser ¹	ad	450 ml
		Pferdeserum		50 ml

2.1.2 Lipide für die Liposomenherstellung

Zur Herstellung der Liposomen wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Lipide verwendet.

Tabelle 2.3: Verwendete Lipide

Abk.	Bezeichnung	Hersteller
DMPC	DL- α -Dimyristoyl-phosphatidylcholin	Nattermann, Köln (D)
DSPC	DL- α -Distearoyl-phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen (D)
SPC	Phosphatidylcholin aus Sojabohnen	Sigma, Deisenhofen (D)
CH	Cholesterol	Sigma, Deisenhofen (D)
DSPE-MPEG	DL- α -Distearoyl-phosphatidylethanolamin-methyl-polyethylenglykol(2000)	Sygena, Liestal (CH)

2.1.3 Linkerlipid

Zur kovalenten Kopplung von kationisiertem Albumin an Liposomen wurde DL- α -Distearoyl-phosphatidylethanolamin-polyethylenglykol(2000)-Maleimid (DSPE-PEG-MI; Strukturformel siehe Abbildung 2.1) eingesetzt. Das modifizierte Lipid wurde von Shearwater Polymers, Huntsville (USA) bezogen.

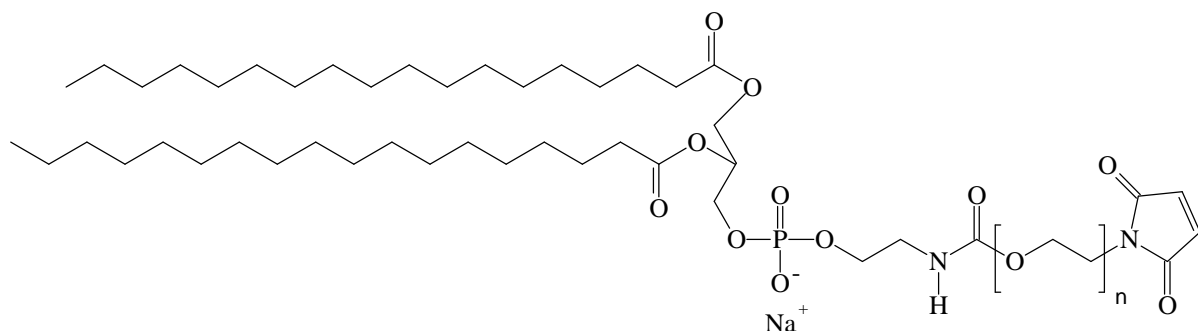


Abbildung 2.1: Linkerlipid DSPE-PEG-MI

2.1.4 Fluoreszenzmarker für Liposomen

2.1.4.1 5(6)-Carboxyfluoreszein

Als Fluoreszenzmarker für das Liposomeninnere wurde 5(6)-Carboxyfluoreszein (CF, Strukturformel siehe Abbildung 2.2), das sich durch eine hohe Wasserlöslichkeit und die aufgrund der negativen Ladung bei physiologischem pH-Wert kaum vorhandene Membranpermeabilität auszeichnet, verwendet. Nicht eingeschlossenes CF kann einfach von den Liposomen abgetrennt werden. Die Detektion geringster Mengen ist aufgrund der starken Fluoreszenz möglich.

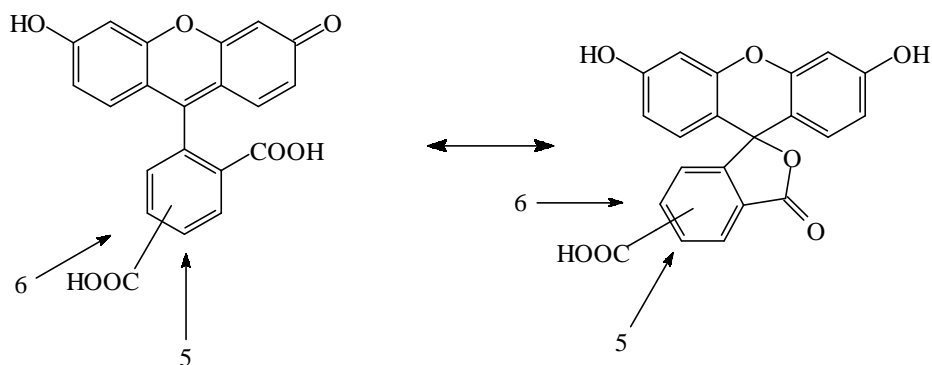


Abbildung 2.2: 5(6)-Carboxyfluoreszein

Das beschriebene Phänomen des „Self-Quenchings“ [168] ist konzentrationsabhängig und bewirkt bei ausreichend hoher Konzentration eine Fluoreszenzlöschung durch Interaktion benachbarter Moleküle. Somit kann mittels fluorimetrischer Bestimmung zwischen liposomal eingeschlossenem und freiem CF unterschieden werden, was die einfache Analyse der Einschlussstabilität ermöglicht. Bei fluorimetrischer bzw. fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der Interaktionen von mit CF beladenen Liposomen mit Zellen ist die starke pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von Fluoreszeinderivaten zu beachten.

2.1.4.2 Rhodamin B-DL- α -dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin

Lissamine[®]-Rhodamin B-DL- α -dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin (Rh-PE, Molecular Probes, Eugene (USA)) wurde als Fluoreszenzmarker für die liposomale Phospholipid-Doppelschicht verwendet. Die Strukturformel ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Da die Absorptions- und Emissionsmaxima sich von denen des 5(6)-Carboxyfluoreszeins hinreichend unterscheiden, ist bei Verwendung geeigneter Filter auch ein paralleler Einsatz beider Fluoreszenzmarker möglich.

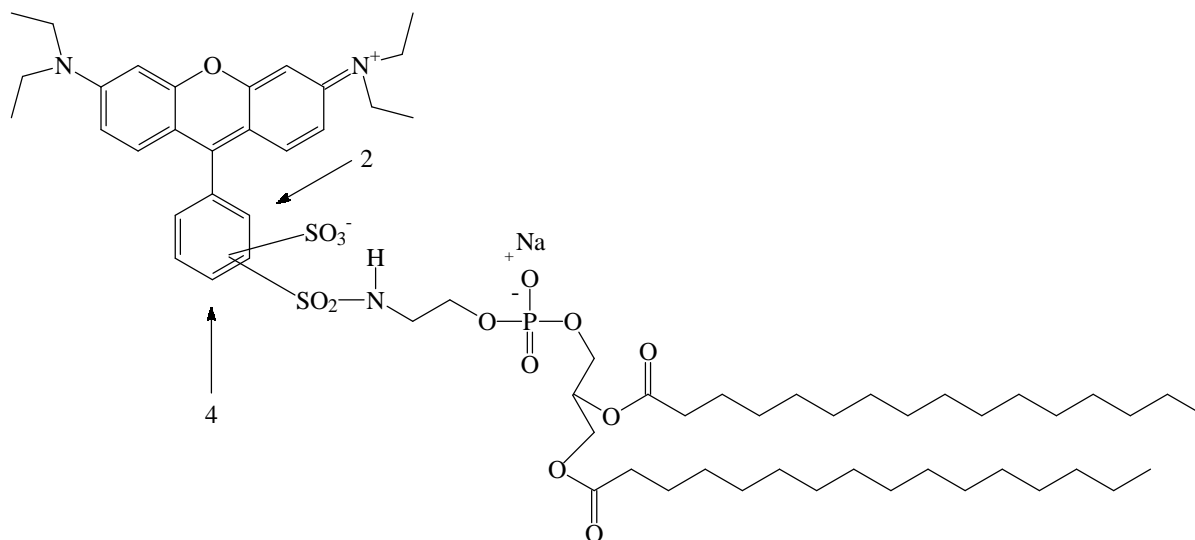


Abbildung 2.3: Lissamine[®]-Rhodamin B-DL- α -dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Fluoreszenzmikroskop

Als Fluoreszenzmikroskop kam ein Leitz Dialux 22 Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)) mit folgender Ausstattung zum Einsatz:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive $10\times / 0,30$; $40\times / 1,3$ Öl; $100\times / 1,25$ Öl
- Fluoreszenz-Auflichtilluminator 3- λ -Ploemopak mit Blau- und Grünfilter

Die Erfassung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der digitalen Kamera Sencam (PCO, Kehlheim (D)), die mit einem HRP060-CMT Adapter (Diagnostic Instruments, Sterling Heights (USA)) auf den Fototubus des Mikroskops aufgesetzt wurde. Die Steuerung der Kamera und Sicherung des Bildmaterials erfolgte mit einem handelsüblichen PC unter Verwendung der zur Kamera gehörenden Interfacekarte und Steuerungssoftware. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Scion Image (Scion, Maryland (USA)) sowie Corel Photo-Paint 7 (Corel, Ottawa (CA)).

2.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

Als konfokales Lasermikroskop wurde das Leica Mikroskop DM IRBE (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)) verwendet. Die Ausstattung dieses Invertmikroskops umfasste:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive $20\times / 0,4$; $40\times / 1,25$ Öl ; $63\times / 1,32$ Öl ; $63\times / 1,0$ W
- luftgekühlter Argon/Krypton-Laser

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software TCS-NT (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)). Die generierten Fluoreszenzbilder und -serien wurden mit den Programmen Scion Image (Scion, Maryland (USA)) sowie Corel Photo-Paint 7 (Corel, Ottawa (CA)) weiterbearbeitet.

2.2.3 Weitere Geräte und Materialien

Alle übrigen verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller/Lieferant
Autoklav (119 l)	Deutsch und Neumann, Berlin (D)
Autosizer [®] IIc	Malvern Instruments, Herrenberg (D)
Branson Sonifier 15 Cell Disruptor	Branson, Danburg (USA)
Brutschrank Cytoperm [®] 2	Heraeus, Hanau (D)
Chromatographiesäulen	LKB, Bromma (S)
Deckglaskammern	Nunc, Wiesbaden (D)
Druckfiltrationszelle Model 202	Amicon, Beverly (USA)
Einwegpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Corning-Costar, Bodenheim (D)

Geräte und Materialien	Hersteller/Lieferant
Elektrophorese-Netzteil PowerPac 1000	Biorad, München (D)
Elektrophorese-Zelle Mini-Protean® II	Biorad, München (D)
Elektrophorese-Zelle Model 111 Mini IEF Cell	Biorad, München (D)
Extruder Liposofast®	Avestin, Ottawa (CA)
Filtriereinheiten Steritop®	Millipore, Eschborn (D)
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser Fluoroskan® II	BioConcept, Allschwil (CH)
Fluorimeter SFM 25	Kontron, Zürich (CH)
Fraktionssammler	LKB, Bromma (S)
Geltrockner SGD 2000	Savant, Holbrook (USA)
Glaskugeln (Ø 2 mm)	Bender und Hobein, Karlsruhe (D)
Glasperlen (Ø 0,45 – 0,5 mm)	B. Braun Biotech, Melsungen (D)
Halbmikroküvetten, Kunststoff	Sarstedt, Ulm (D)
Halbmikroosmometer	Knaur, Berlin (D)
Homogenisator (50 ml) mit Teflon-Pistill	Bender und Hobein, Karlsruhe (D)
Injektionsventil mit 912 µl Probenschleife	Gamma-Analysentechnik, Bremerhaven (D)
Invertmikroskop	Zeiss, Oberkochen (D)
Kühlthermostat K/F3	Haake, Karlsruhe (D)
Kulturschalen (6-, 12-, 24-, 96-well)	Corning-Costar, Bodenheim (D)
Kulturschalen mit Filtereinsätzen (Transwell®-Snapwell®, Transwell®-clear)	Corning-Costar, Bodenheim (D)
Minikonzentratoren Centricon® 30	Millipore, Eschborn (D)
Objektträgerkammern	Nunc, Wiesbaden (D)
Pasteurpipetten	WU, Mainz (D)
pH-Elektrode GATionode® II	Gamma-Analysentechnik, Bremerhaven (D)
pH-Meter	Orion Research, Beverly (USA)
Pipetten für Wechselspitzen	Labsystems, Frankfurt (D)
Pipettierhilfen (Pipetboy®, Acuboy®)	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Ulm (D)
Rotavapor® R	Büchi, Flawil (CH)
Schlauchpumpe	Ismatec, Zürich (CH)
Schüttelwasserbad	Renggli, Rotkreuz (CH)
Spektralphotometer Beckman DU 640	Beckman, München (D)
Spritzenvorsatzfilter Minisart® N	Sartorius, Göttingen (D)
Sterilwerkbänke, horizontaler u. vertikaler Luftstrom	CEAG, Dortmund (D)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg (D)
Vakuum-Controller CVC2	Vacuubrand, Wertheim (D)
Vakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand, Wertheim (D)
Vortex-Mischer	Bender und Hobein, Karlsruhe (D)
Wasserbadkreisschüttler	Infors, Bottmingen (CH)
Widerstandsmeßgerät Millicell®-ERS	Millipore, Eschborn (D)
Zentrifugen Typ J21C und Typ J6C	Beckman, München (D)
Zentrifuge Labofuge® GL mit Zytozentrifugations-Einsätzen	Heraeus, Hanau (D)
Zentrifugenröhrchen 15 ml PP und 50 ml PP	Greiner
Zentrifugenröhrchen 35 ml PC und 250 ml PC	Nalgene, Rochester (USA)
Zetasizer® 3000 HS	Malvern Instruments, Herrenberg (D)

2.3 Zellkultur

Alle wesentlichen Arbeitsschritte wie das Beschichten der Kulturplatten, das Aussähen der Zellen und der Medienwechsel wurden unter aseptischen Arbeitsbedingungen (Sterilwerkbank) durchgeführt.

2.3.1 Isolierung von Kapillar-Endothelzellen aus Schweinehirn

Die Isolierung der Kapillar-Endothelzellen erfolgte auf Basis der von Bowman [25] sowie von Audus und Borchardt [11] beschriebenen mechanisch-enzymatischen Methoden:

Frische Schweinehirnhälften (ca. 300 g) wurden in kaltem MEM vom Schlachthof ins Labor transportiert und von den Hirnhäuten befreit. Nach Spülen mit 200 ml MEM wurde die graue Substanz mit einem Skalpell abgeschabt, in ca. 1 mm² große Stücke zerteilt und in einer Flasche mit 150 ml kaltem MEM gesammelt. Das Volumen wurde mit vorgewärmtem MEM (37 °C) zu 485 ml ergänzt, der pH unter Rühren mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt und 2,5 g Dispase in 15 ml MEM zugegeben (Endkonzentration 0,5 %). Nun wurde 2 h bei 37 °C auf dem Schüttelwasserbad bei 30 % Schüttelintensität inkubiert.

Nach Überführen der Hirnsuspension in vier 250 ml Zentrifugenbecher wurde das Hirngewebe abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 4 °C, 1000 g, 10 min.) und der Überstand wurde verworfen. Die Hirnmasse wurde in Dextranlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 4 °C, 5800 g, 12 min.). Das aufschwimmende Gewebe wurde mit der Dextranlösung abgesaugt und verworfen.

Die verbliebenen Pellets aus Hirnkapillaren wurden in insgesamt 15 ml MEM resuspendiert und in einem sterilen Erlenmeyerkolben gesammelt. Nach Zugabe von 20 mg Collagenase/Dispase in 5 ml MEM wurde 4 h bei 37 °C auf dem Schüttelwasserbad bei 30 % Schüttelintensität inkubiert.

Sechs Dichtegradienten (je 32 ml) wurden durch Zentrifugation einer Percoll-Lösung (50 %) vorbereitet (Beckmann JA-20-Rotor, 4 °C, 26000 g, 1 h). Die Kapillarsuspension wurde durch eine Polypropylen-Gaze der Maschenweite 150 µm filtriert, mit MEM auf 50 ml verdünnt und abzentrifugiert (Beckman Tischzentrifuge, 4 °C, 700 g, 10 min.).

Das Pellet wurde mit 9 ml MEM resuspendiert, jeweils 1,5 ml der Suspension wurden auf die Percoll-Gradienten aufgetragen und zentrifugiert (Beckmann Tischzentrifuge, 4 °C, 1000 g, 10 min.).

Die mittleren diffusen, bräunlich-weißen Banden mit den Kapillar-Endothelzellen wurden abgesaugt (10 - 13 ml), in je einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit serumhaltigem kaltem MEM verdünnt und zentrifugiert (Beckmann-Tischzentrifuge, 4 °C, 700 g, 10 min.).

Die so erhaltenen Endothelzellen wurden in Zellkulturmedium (EM) mit 22,2 % Serum resuspendiert und ein Teil davon nach Zugabe von zwei Teilen Trypanblau-Lösung (0,4 %) in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach dem Zählen wurde DMSO zugegeben (Endkonzentration 10 %). Die Zellsuspension wurde mit Einfriermedium (20 % Serum, 10 % DMSO) weiter verdünnt (10 Mio. Zellen/ml), in Kryo-Röhrchen abgefüllt und in den Ultratiefkühlschrank (-70 °C) überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert. Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung der Zellisolierung.

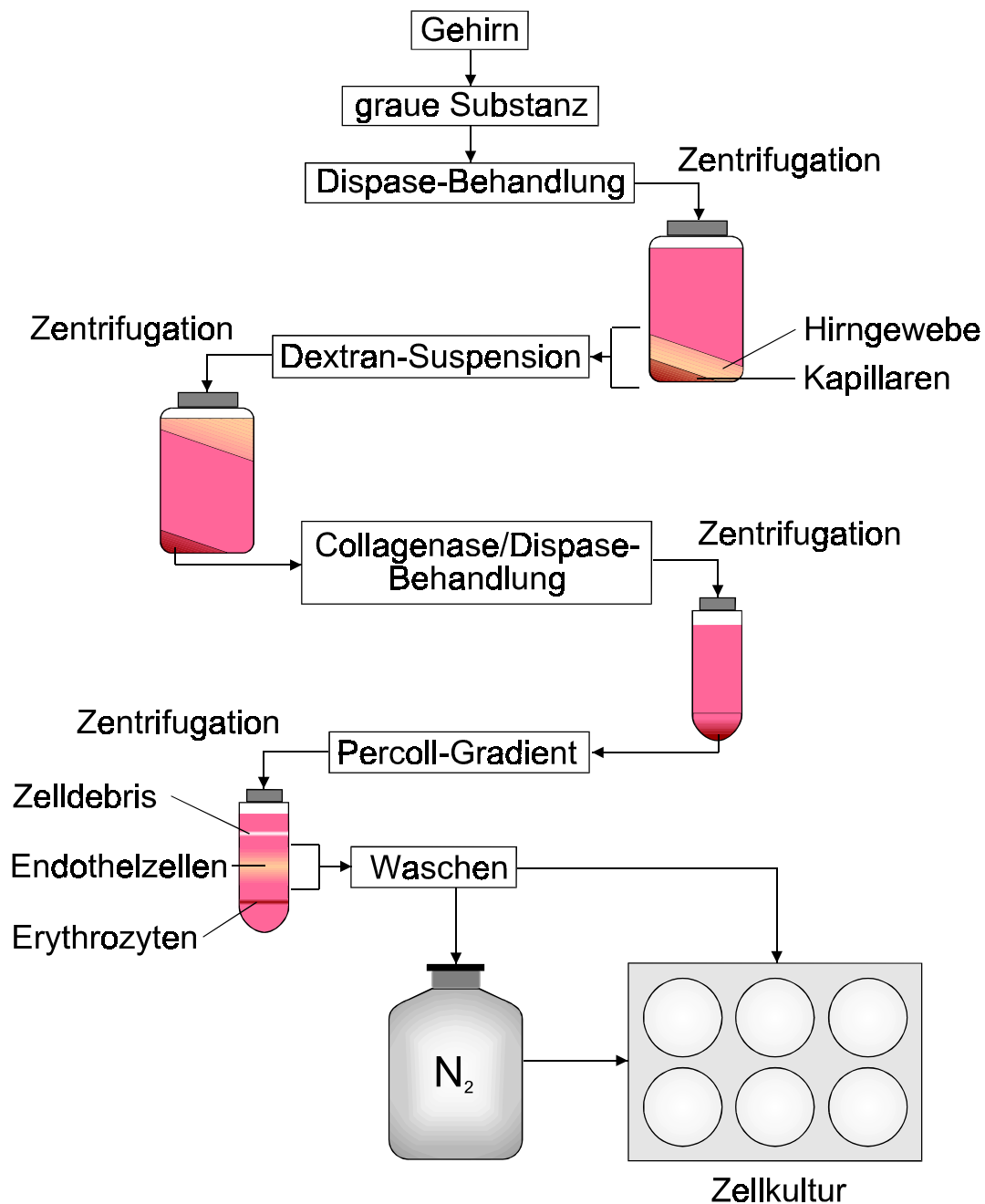


Abbildung 2.4 Isolierung von Kapillar-Endothelzellen aus Schweinehirn

2.3.2 Gewinnung von Astrozyten-konditioniertem Medium

Zur Gewinnung von Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) wurden Astrozyten aus neonatalen Ratten nach den Methoden von Noble und Murray [140] sowie Lilien et al. [112] isoliert. Vier ein Tag alte Wistar-Ratten wurden decapitiert, und die Gehirne wurden entnommen. Nach dem Entfernen der Hirnhäute wurde die Cortex der beiden Großhirnhemisphären durch ein Nylonsiebgewebe mit einer Maschenweite von 60 µm gedrückt, und es wurde mit insgesamt 100 ml Astrozyten-Zellkulturmedium (AM) nachgespült. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette homogenisiert, auf vier Zellkulturflaschen (75 cm²) aufgeteilt und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte kultiviert.

Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Nach dem Erreichen der Konfluenz (12 Tage) wurden die Zellen zur Entfernung von weniger gut anhaftenden, kontaminierenden Zellen für 24 h auf dem Wasserbadkreisschüttler bei 37 °C mit 260 Upm agitiert. Die am Boden der Zellkulturflaschen verbliebenen Zellen wurden zweimal mit je 10 ml pro Flasche Trypsin-EDTA abgelöst, durch zweimaliges Zentrifugieren (700 g, 10 min.) und resuspendieren in AM gewaschen und mit insgesamt 300 ml AM verdünnt.

Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 12 mit Poly-D-Lysin beschichtete (siehe 2.3.4.1) Zellkulturflaschen (75 cm²) aufgeteilt und weiter kultiviert. Nach dem erneuten Erreichen der Konfluenz (3 Tage) wurden die Zellen für drei Tage mit Cytosin-arabinofuranosid-haltigem (20 µM) AM behandelt. Diese Behandlung wurde nach drei Tagen Kultur in normalem AM wiederholt. Anschließend wurde nach drei weiteren Tagen Kultur in normalem AM auf Endothel-Zellkulturmedium (EM) umgestellt. Das so erhaltene ACM wurde nach drei Tagen auf den Zellen abgenommen, durch eine 0,22 µm Membran filtriert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen tiefgefroren (-20 °C). Zur Kultivierung von Endothelzellen wurde ACM im Verhältnis 1:1 mit frischem EM gemischt. Die Astrozytenkulturen wurden sechs Wochen lang zur Gewinnung von ACM genutzt, wobei alle drei Tage ein Medienwechsel erfolgte.

2.3.3 Isolierung von Kapillaren aus Schweinehirn

Die Isolierung von Kapillaren erfolgte mit einer rein mechanischen Methode in Anlehnung an [157]. Alle Lösungen wurden mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und auf 4 °C gekühlt. Graue Substanz (vgl. 2.3.1) wurde in der fünffachen Menge (m / V) Puffer B suspendiert und in einem Homogenisator (50 ml) mit Teflon-Pistill (Spaltbreite 0,25 mm) mit sechs drehenden Auf- und Ab-Bewegungen homogenisiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer Lösung von 30 % Dextran in Puffer B wurde das Homogenat zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 4 °C, 5800 g, 12 min.). Das Kapillar-Pellet wurde mit 20 ml Puffer A resuspendiert und unter Nachspülen mit weiteren 10 ml Puffer A durch eine Nylon-Gaze der Maschenweite 200 µm filtriert.

Die Kapillar-Suspension wurde zur Reinigung über eine Säule (15 mm × 50 mm) aus Glasperlen (\varnothing 0,45 mm bis 0,5 mm,) gegeben. Nach Spülen mit 500 ml Puffer A wurden die Glasperlen in ein Becherglas überführt, und 20 ml Puffer A wurden zugegeben. Die Kapillaren wurden durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstab von den Glasperlen gelöst, die Kapillar-Suspension wurde abdekantiert und zentrifugiert (4 °C, 200 g, 5 min.). Zum Entfernen von BSA wurden die Kapillaren mehrmals in Puffer B resuspendiert und erneut zentrifugiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.3.4 Kultivierung von Kapillar-Endothelzellen

2.3.4.1 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße

Abhängig vom geplanten Versuch wurden Zellkulturschalen und -flaschen verschiedener Formate aus Polystyrol sowie Filtereinsätze aus Polycarbonat oder Polyester eingesetzt. Ausserdem wurden für mikroskopische Untersuchungen Objektträger- und Deckglaskammern verwendet, deren Glasoberfläche mit Poly-D-Lysin (wässrige Lösung, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 16 h) vorbehandelt wurde. Die Kulturflächen wurden dann zunächst mit Collagen, gelöst in Wasser, (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 2 h behandelt. Anschließend wurde für 1 h mit in PBS gelöstem Fibronectin (4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Zellaussaat.

2.3.4.2 Zellkultivierung

Tiefgefrorene Zellen wurden durch Agitation im Wasserbad aufgetaut, mit Anzuchtmedium (AZM) verdünnt und in einer Dichte von 100.000 Zellen/ cm^2 in die vorbehandelten Kulturgefäße pipettiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO_2 . Am ersten Tag nach dem Aussähen wurde auf normales EM gewechselt, und dieses wurde an jedem zweiten Tag ausgetauscht. Eine konfluente Zellschicht bildete sich nach 6 bis 7 Tagen. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Bei Verwendung von ACM oder serumfreiem Medium (SFM) kam dieses ab dem dritten Tag zum Einsatz. Bei einigen Experimenten wurde dem Medium beim letzten Medienwechsel zwei Tage vor dem Experiment das cAMP-Analogon CPT-cAMP (250 μM) und der Phosphodiesterasehemmstoff RO-20-1724 (17,5 μM) zugesetzt.

2.3.5 Charakterisierung von Kapillar-Endothelzellen

2.3.5.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild

Das Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen wurde bei jedem Medienwechsel und vor jedem Versuch durch Betrachten der Kulturgefäße unter dem Invertmikroskop beurteilt.

2.3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von charakteristischen Proteinen

Die endothelzellspezifischen Markerproteine von Willebrand-Faktor (vWF) und Vimentin wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden BCECs in Objektträgerkammern (8 Kammern pro Objektträger) bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und fixiert (Vimentin: Methanol für 5 min. bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; vWF: 4 % Paraformaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd in PBS für 30 min. bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS im Zeitraum von 30 min. wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein für 30 min. inkubiert. Hierbei kamen verschiedene Verdünnungen des Antikörpers, entsprechend den Herstellervorschriften, zum Einsatz. Das Volumen betrug $20\text{ }\mu\text{l}$ pro Kammer des Objektträgers. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS im Zeitraum von 30 min. erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper. Bei diesem Schritt wurde beim vWF-Nachweis auch Propidiumiodid ($0,1\text{ }\mu\text{M}$) zur Anfärbung der Zellkerne zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden einige Kammern ausschließlich mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach dem abschließenden fünfmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Eindeckmedium Vectashield® abgedeckt, mit Deckgläschen versehen, mit Nagellack versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (vgl. 2.2.1) betrachtet.

2.3.5.3 Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der als Markerenzym für die BHS geltenden γ -Glutamyl-Transferase (GGT) erfolgte auf Basis der von Caspers und Diglio [33] beschriebenen Methode. Die BCECs wurden hierzu in 25 cm^2 Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit je 5 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier HBSS gewaschen und durch zweimalige Behandlung mit je $2,5\text{ ml}$ Trypsin-EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (700 g , 10 min.) und in 1 ml HBSS resuspendiert. Die Zellzahl wurde nach Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ 0,4 % Trypanblau-Lösung zu $25\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je $200\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden mit $300\text{ }\mu\text{l}$ HBSS und $500\text{ }\mu\text{l}$ GGT-Reaktionsgemisch versetzt und für 40 min. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur Überprüfung der Linearität wurden verschiedene Verdünnungen der Zellsuspension untersucht. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von $500\text{ }\mu\text{l}$ 3 N Essigsäure gestoppt und die Absorption bei 410 nm gegen einen Blindwert bestimmt.

Bei der Reaktion wird das Glutamin des L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid durch GGT auf Glycylglycin übertragen und p-Nitroanilin wird freigesetzt, das photometrisch bestimmt werden kann. Die Auswertung erfolgte über den molaren Absorptionskoeffizienten ($8800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die errechnete Enzymaktivität in U (Bildung von 1 nmol p-Nitroanilin pro Minute bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde auf 10^6 Zellen bzw. mg Gesamtprotein (Bestimmung siehe 2.3.5.4) bezogen.

2.3.5.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit dem Biorad-Proteinassay nach der Methode von Bradford [26]. Zur Konfluenz kultivierte BCECs wurden dreimal mit Transportpuffer (TP) gewaschen und durch zehn Minuten lange Einwirkung von Ameisensäure (50 %) lysiert. Je 100 µl des Lysats wurden mit 1 ml des 1:5 mit Wasser verdünnten Proteinassay-Konzentrats vermischt und nach 5 min. bei 595 nm spektralphotometrisch gegen einen Blindwert vermessen. Als Standard dienten Verdünnungen einer Rinder-Serumalbumin-Lösung. Der Proteingehalt der Standards lag zwischen 3 µg und 20 µg.

2.3.5.5 Bestimmung des transendothelialen Widerstandes

Die Messung des transendothelialen Widerstandes (TEER) erfolgte an auf Filtereinsätzen kultivierten BCECs mit dem Millicell[®]-ERS-Gerät und einem STX-2 Elektrodensystem. Das Elektrodensystem bestand aus zwei Elektrodenhaltern, die jeweils eine Silber-/Silberchlorid-Elektrode zur Messung der Spannung und eine Silberelektrode zur Messung der Stromstärke aufwiesen. Ein Elektrodenhalter war um 2,5 mm länger ausgeführt, was bei einer direkten Messung in den Zellkulturschalen eine Verletzung des Zellmonolayers verhinderte. Aus den gemessenen Strom- und Spannungswerten ermittelte das Messgerät den Widerstand in Ohm.

Von den so erhaltenen Werten wurde der Blindwert (Widerstand des beschichteten Filters) abgezogen, und der resultierende Wert wurde mit der Filterfläche multipliziert, so dass sich der TEER in der Einheit $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ ergab.

2.3.5.6 Transport-Experimente mit fluoreszierenden Substanzen

Da die Eignung der BCECs als Modell für den Transport an der BHS *in vivo* im Wesentlichen von der Zelldichte abhängt, wurden Transport-Experimente mit fluoreszierenden Substanzen, die vorwiegend parazellulär diffundieren, durchgeführt. Verwendet wurden CF und FITC-konjugierte Dextrane mit einem Molekulargewicht von 4000 Da bis 70000 Da. Der Transport wurde in zwei verschiedenen Modellen untersucht, einem Diffusionskammer-System der Firma Corning-Costar mit Transwell[®]-Snapwell[®]-Einsätzen und direkt in den Zellkulturplatten mit Transwell[®] clear-Einsätzen (vgl. 1.2.2.2.2).

2.3.5.6.1 Transport-Experimente im Diffusionskammer-System

Für Transport-Experimente im Diffusionskammer-System wurden Zellen auf Collagen- und Fibronectin-beschichteten Transwell[®]-Snapwell[®]-Einsätzen in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen kultiviert. Die verwendeten Filtereinsätze aus Polycarbonat hatten eine Fläche von 1,13 cm² und eine Porenweite von 0,4 µm. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in den Kulturplatten mit TP gewaschen, die Filtereinsätze wurden vorsichtig von den Haltern gelöst und in die Diffusionskammern eingesetzt.

Nach dem Zusammensetzen der Diffusionskammern wurden diese in den auf 37 °C vorgewärmten Heizblock eingesetzt, jede Kammerhälfte wurde mit 6 ml 37 °C warmen TP gefüllt und der Carbogen-Gasfluss (95 % O₂, 5 % CO₂) wurde so eingestellt, dass pro Sekunde ca. 4 bis 6 Gasbläschen aufstiegen. Nach einer Vorinkubationsdauer von 20 min. wurde der Inhalt der Donorhälfte abgesaugt und durch 6 ml einer Lösung der Testsubstanz in TP ersetzt. Die Konzentrationen der Testsubstanzen lagen zwischen 0,1 mg / 100 ml und 50 mg / 100 ml. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben von jeweils 0,5 ml aus der Akzeptorhälfte entnommen, und das fehlende Volumen wurde mit frischem TP ergänzt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden gesammelt.

Das Vermessen der Proben erfolgte mit dem Fluoreszenzlesegerät Fluoroskan II. Hierzu wurden jeweils 200 µl des Probenvolumens in schwarze Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen pipettiert. Die Messung gegen Blindwerte erfolgte mit folgenden Parametern:

Filter Set	2 (FITC; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$)
Integration Time	2
Temperatur	Ambient
Scale	Absolut Scale
Calculation	No Calculation

Parallel zu den Proben wurden Referenzlösungen der entsprechenden Testsubstanzen vermessen. Für die Auswertung der Messwerte wurde der Anteil der Testsubstanz, der pro Zeiteinheit in das Akzeptorkompartiment diffundierte, berechnet. Für die Berechnung musste ab der zweiten Probenentnahme die Verdünnung durch das ergänzte Puffervolumen berücksichtigt werden:

$$C_{n \text{ korr}} = \frac{C_n \times V_{\text{gesamt}} + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i \times V_{\text{Probe}})}{V_{\text{gesamt}}} \quad (1)$$

$C_{n \text{ korr}}$	korrigierte Konzentration zur Probenentnahme n; $n > 1$	[µg/ml] oder [µmol/ml]
C_n	Konzentration zur Probenentnahme n	[µg/ml] oder [µmol/ml]
V_{gesamt}	Gesamtvolumen des Akzeptorkompartiments	[ml]
V_{Probe}	Probenvolumen	[ml]

Aus den korrigierten Konzentrationen wurde dann der Anteil an Testsubstanz (in %), der zum jeweiligen Zeitpunkt vom Donor in den Akzeptor diffundierte, berechnet:

$$T_n = \frac{C_{n \text{ korr}}}{C_o} \times 100 \quad (2)$$

T_n	transportierter Anteil zum Zeitpunkt n	[%]
C_o	Konzentration im Donor bei Versuchsbeginn	[µg/ml] oder [µmol/ml]

Als weitere Grösse zur Charakterisierung der Transportrate wurde der apparente Permeabilitätskoeffizient berechnet:

$$P_{app} = \frac{Cn_{korr} \times V_{gesamt}}{t} \times \frac{l}{A} \times \frac{1}{c_o} \quad (3)$$

P_{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient	[cm/s]
t	Zeit	[s]
A	Fläche des Filters	[cm ²]

2.3.5.6.2 Transport-Experimente in Transwell®-clear Kulturgefäßen

Für Transport-Experimente in mit Transwell®-clear-Filtereinsätzen bestückten Kulturplatten wurden die Zellen auf 1 cm² grossen Einsätzen in Platten mit 12 Vertiefungen kultiviert. Die Polyester-Filter wiesen eine Porenweite von 0,4 µm auf. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst dreimal mit 37 °C warmen TP gewaschen und 20 min. bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Das Volumen auf der apikalen Zellseite (Donorkompartiment) betrug hierbei 0,5 ml; auf der basolateralen Seite (Akzeptorkompartiment) wurde 1 ml eingesetzt. Nach der Vorinkubation wurde der TP aus beiden Kompartimenten abgesaugt und basolateral durch frischen TP sowie apikal durch eine Lösung der Testsubstanz in TP ersetzt. Nun wurden die Zellkulturplatten bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert und dabei durch einen Kreisschüttler (3 mm Orbit) mit 500 upm bewegt. Zu definierten Zeitpunkten wurden die kompletten Filtereinsätze mit der Inkubationslösung entnommen und in mit frischem 37 °C warmen TP gefüllte Zellkulturplatten umgesetzt. Die in der vorherigen Zellkulturplatte verbliebenen Proben wurden wie bei den Transport-Experimenten im Diffusionskammer-System mit dem Fluoroskan II vermessen. Zur Auswertung wurden wieder die prozentuale Transportrate und der P_{app} berechnet, wobei hier keine Verdünnung der Proben berücksichtigt werden musste.

2.3.5.7 Transport-Experimente mit nicht fluoreszierenden Substanzen

Im Laufe der Arbeit wurden auch Experimente mit nicht-fluoreszierenden Substanzen durchgeführt. Es kamen hierbei unmarkierte sowie radioaktiv markierte Substanzen zum Einsatz. Radioaktive Substanzen wurden nur in Spuren (1 bis 2 µCi pro well) eingesetzt, die gewünschte Konzentration wurde dann mit der jeweiligen unmarkierten Substanz eingestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgte so wie in 2.3.5.6.1 bzw. 2.3.5.6.2 beschrieben. Die Analyse der Proben erfolgte bei unmarkierten Substanzen mittels HPLC, bei Experimenten mit radioaktiven Stoffen wurde die Flüssigszintillations-Spektroskopie eingesetzt.

2.4 Kationisiertes Albumin als Vektor

2.4.1 Synthese von kationisiertem Albumin

Zur Kationisierung von Rinder-Serumalbumin nach den Methoden von [68, 78] wurden 250 ml einer 0,9 M Ethylendiamin-dihydrochlorid-Lösung (pH 4,75) mit 4 ml einer 50 %igen (m/V) Albumin-Lösung gemischt, und 0,3625 g des Carbodiimid-Derivates EDAC wurden zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter Überwachung des pH-Wertes wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,3 ml 4 M Acetatpuffer pH 4,75 abgebrochen.

Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte durch Aufkonzentration in einer Druckfiltrationszelle (Endvolumen 25 ml), Dialyse gegen bidestilliertes Wasser und Lyophilisation. Gefriergetrocknetes kationisiertes Albumin wurde bei 4 °C gelagert. Durch die Reaktion werden kettenendständige Säurefunktionen der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure in die N-(Aminoethyl)-derivate des Asparagins bzw. Glutamins umgewandelt. Durch die Aminogruppe weist das modifizierte Protein bei physiologischem pH eine positive Ladung auf. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

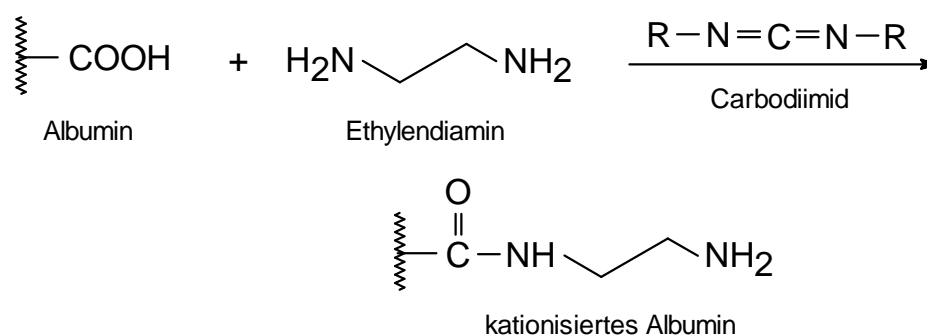


Abbildung 2.5: Kationisierung von Albumin

2.4.2 Fluoreszenzmarkierung von kationisiertem Albumin

Zur Fluoreszenzmarkierung von kationisiertem Albumin (CBSA) mit Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) nach [193] wurden 350 mg CBSA und 10 mg FITC in je 100 ml 0,15 M Phosphatpuffer pH 9,0 gelöst. CBSA wurde in einem 400 ml Becherglas vorgelegt, der pH auf 9,0 korrigiert und die FITC-Lösung wurde langsam zugetropft. Nach 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von einem Tropfen 25 % Ammoniak abgebrochen, die Lösung wurde in einer Druckfiltrationszelle aufkonzentriert (Endvolumen 25 ml), gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Bei der Reaktion entsteht durch Addition des Isothiocyanates an primäre Aminogruppen des Proteins und anschließenden Austausch des Schwefels durch einen Sauerstoff ein Harnstoffderivat (Abbildung 2.6).

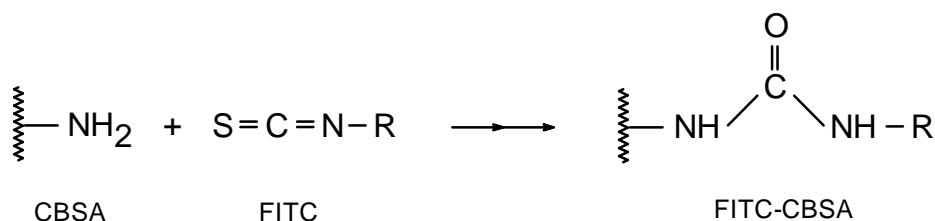


Abbildung 2.6: Fluoreszenzmarkierung von CBSA mit FITC (R = Fluoreszein)

2.4.3 Charakterisierung von kationisiertem Albumin und fluoreszenzmarkiertem kationisiertem Albumin

2.4.3.1 Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in der Mini-Protean® II Elektrophoresezelle mit dem Puffersystem nach Laemmli [104]. Zur Herstellung des Trenngels wurden 2,5 ml Lsg. L und 3,5 ml Lsg. N mit Wasser zu 10 ml verdünnt. Diese Lösung wurde 10 min. unter Rühren im Vakuum entgast, mit 50 µl einer frisch angesetzten Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) und 5 µl TEMED versetzt und 5 cm hoch in die im Gießstand mit 0,75 mm Spacern zusammengesetzte Gelform eingefüllt.

Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nun wurde die Lösung für das Sammelgel aus 2,5 ml Lsg. M, 1,5 ml Lsg. N und 6 ml Wasser gemischt und 10 min. unter Rühren im Vakuum entgast. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isobutanol entfernt, die Sammelgel-Lösung mit 50 µl einer frisch angesetzten Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) und 10 µl TEMED versetzt und auf das Trenngel pipettiert. In die vollständig gefüllte Gelform wurde nun der Probenkamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde die Elektrophoresekammer entsprechend der Herstellervorschrift zusammengesetzt und mit der Lsg. Q gefüllt.

Die zu untersuchenden Proteine (BSA, CBSA und FITC-CBSA) wurden in Probenpuffer gelöst und zur Denaturierung für 4 min. auf ca. 95 °C aufgeheizt. Anschließend wurden die Proben (5 bis 10 µg Protein) und ebenfalls in Probenpuffer gelöster Protein-Standard mit einer Hamilton-Spritze in die Probenaschen eingefüllt (max. 25 µl). Der folgende Elektrophoreselauf wurde mit einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Der Lauf wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Gelende erreicht hatte (ca. 60 min.). Unmittelbar darauf wurde das Trenngel aus der Form gelöst, vom Sammelgel befreit und für 1 h in die Färbelösung gelegt. Die Entfärbung erfolgte mit der Entfärbelösung unter mehrfachem Wechsel und dauerte ca. 4 h. Nach der Entfärbung wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt, mit einer dünnen Polyethylen-Folie bedeckt und im Geltrockner bei 80 °C für 3 h getrocknet.

2.4.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von CBSA und FITC-CBSA erfolgte mit der Mini-IEF Elektrophoresezelle. Hierzu wurde zunächst die Gel-Trägerfolie mit wenig Wasser auf einer Glasplatte fixiert und mit der Folie nach unten auf den Gießstand gelegt. Die Gellösung wurde aus 2 ml Lsg. N, 2 ml Glycerin (25 %), 0,5 ml Ampholyt 3-10 und 5,5 ml Wasser gemischt und 5 min. unter Rühren im Vakuum entgast. Nach Zugabe von 15 µl einer frisch angesetzten Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %), 50 µl Riboflavin-Lösung (0,1 %) und 3 µl TEMED wurde die Gellösung unter die Trägerfolie auf den Gießstand pipettiert und unter einer UV-Lampe für 60 min. polymerisiert.

Wässrige Lösungen (2,5 mg/ml) der zu untersuchenden Proteine (BSA, CBSA und FITC-CBSA) und der IEF-Standard wurden mit Hilfe der Probenschablone und einer Mikroliterpipette mit lang ausgezogener Spitze auf das Gel aufgetragen. Das Probenvolumen betrug maximal 2 µl. Nach dem Trocknen der Proben wurde das Gel direkt auf die Graphitelektroden der IEF-Kammer gelegt und der Lauf wurde gestartet. Dabei wurden für 15 min. 100 V angelegt, für weitere 15 min. 200 V und schließlich für 60 min. 450 V.

Unmittelbar nach dem Ende des Laufs wurde das Gel von den Elektroden genommen, von der Glasplatte entfernt und für 60 min. in IEF-Färbelösung gelegt. Die Entfärbung erfolgte 60 min. lang in IEF-Entfärbelösung I und anschließend 2 h lang in IEF-Entfärbelösung II. Das Trocknen des Gels erfolgte im Luftstrom (Sterilwerkbank) über Nacht.

2.4.3.3 Bestimmung des molaren Verhältnisses FITC : CBSA in FITC-CBSA

Zur näherungsweisen Bestimmung des molaren Verhältnisses FITC : CBSA in FITC-CBSA wurden Lösungen von CBSA (10 mg / 100 ml), FITC (0,2 mg / 100 ml) und FITC-CBSA (10 mg / 100 ml) in PBS hergestellt und bei 278 nm und 492 nm im Spektralphotometer vermessen. Die Zahl der durchschnittlich pro CBSA-Molekül eingefügten FITC-Moleküle wurde aus den gemessenen Absorptionen näherungsweise berechnet [193].

$$c_{FITC} = \frac{A_{FITC-CBSA}^{492}}{A_{FITC}^{492}} \times 0,2 \text{ mg/ml} \quad (4)$$

$$c_{CBSA} = \frac{\left(A_{FITC-CBSA}^{280} - \frac{A_{FITC}^{280}}{A_{FITC}^{492}} \times A_{FITC-CBSA}^{492} \right)}{A_{CBSA}^{280}} \times 10 \text{ mg/ml} \quad (5)$$

$$\frac{n_{FITC}}{n_{CBSA}} = \frac{M_{CBSA}}{M_{FITC}} \times \frac{c_{FITC}}{c_{CBSA}} \quad (6)$$

c_{FITC}	Konzentration von FITC in der FITC-CBSA-Lösung	[mg/ml]
$A_{FITC-CBSA}^{492}$	Absorption der FITC-CBSA-Lösung bei 492 nm	
A_{FITC}^{492}	Absorption der FITC-Lösung bei 492 nm	
A_{FITC}^{280}	Absorption der FITC-Lösung bei 280 nm	
c_{CBSA}	Konzentration von CBSA in der FITC-CBSA-Lösung	[mg/ml]
$A_{FITC-CBSA}^{280}$	Absorption der FITC-CBSA-Lösung bei 280 nm	
A_{CBSA}^{280}	Absorption der CBSA-Lösung bei 280 nm	
$\frac{n_{FITC}}{n_{CBSA}}$	Stoffmengenverhältnis von FITC zu CBSA in FITC-CBSA	[mol/mol]
M_{CBSA}	Molekulargewicht von CBSA	67000 Da
M_{FITC}	Molekulargewicht von FITC	390 Da

2.4.4 Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Albumin und kationisiertem Albumin in Endothelzellen

Für die Untersuchung der Aufnahme von FITC-BSA und FITC-CBSA wurden BCECs in Kulturplatten mit 96 Vertiefungen kultiviert. Die Versuche wurden 1 bis 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C oder 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit je 200 µl TP gewaschen und für 20 min. vorinkubiert. Danach wurde mit den in TP gelösten Proteinen (je 100 µl) inkubiert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen viermal mit 4 °C kaltem TP gewaschen und die Fluoreszenz wurde in den Platten direkt mit dem Fluoroskan II gemessen. Zur Untersuchung der Adsorption der Proteine an die verwendeten Zellkulturplatten wurden die Experimente auch mit Kollagen-Fibronectin beschichteten Kulturplatten ohne BCECs durchgeführt.

2.4.5 Sulfhydrierung von Albumin und kationisiertem Albumin

Zur Sulfhydrierung nach der Methode von [49, 77] wurden 100 mg BSA oder CBSA in 10 ml HEPES-EDTA-Puffer gelöst und pro ml dieser Lösung wurden 2,5 bis 40 µl einer Lösung von SATA in DMSO (10 mg/ml) zugegeben. Das Gemisch wurde mit N₂ begast und nach 30 min. Reaktionszeit durch mehrfaches Zentrifugieren und Resuspendieren mit HEPES-EDTA-Puffer in einem Centricon[®]-30 Minikonzentrator aufgearbeitet (Endkonzentration ca. 20 mg/ml). Das Reaktionsschema ist in Abbildung 1.13 C (Seite 23) dargestellt.

Die so modifizierte Proteinlösung wurde bis zur Verwendung zur Kopplung an Liposomen bei –20 °C gelagert. Die Anzahl der eingefügten SH-Gruppen wurde nach Aktivierung mit Hydroxylamin (siehe 2.5.3) mit der Methode von Ellman [54] bestimmt. Dazu wurden 100 µl aktiviertes Protein mit 600 µl Puffer pH 8 und 300 µl einer Lösung von DTNB in PBS

(10 mg / 40 ml) versetzt und nach 10 min. wurde die Extinktion im Spektralphotometer bei 412 nm gegen Standard- und Blindwerte bestimmt. Als Standard kam Cystein (0,1 mM bis 0,6 mM) zum Einsatz. Da Hydroxylamin das Messergebnis beeinflusst [77], wurden Standard- und Blindwerte ebenfalls mit Hydroxylamin versetzt.

2.5 Herstellung von Liposomen und Proteinkopplung

2.5.1 Herstellung von Liposomen

Alle Liposomenchargen wurden nach der üblichen Filmmethode hergestellt. Dazu wurden die Lipide in einem Rundkolben eingewogen und in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (Volumenverhältnis 2:1) gelöst. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei 30 °C und mit langsam steigendem Unterdruck (bis 100 mbar) abgezogen. Der entstandene Lipidfilm wurde 90 min. bei 30 °C und 10 mbar am Rotationsverdampfer und anschließend 10 min. im Stickstoffstrom nachgetrocknet.

Die Lösungsmittelfreiheit wurde durch Geruchssprobe überprüft. Zur Herstellung der Liposomen wurde der Lipidfilm 2 h mit wässrigen Lösungen oberhalb der Phasenübergangstemperatur unter Zusatz von 10 Glaskugeln (2 mm Durchmesser) hydratisiert. Der Ansatz wurde ca. alle 10 min. manuell geschüttelt. Dabei entstanden Liposomen in Form von MLV. Zur Dispergierung der MLV-Liposomen kam sowohl die Ultraschall- als auch die Extrusionsmethode zum Einsatz:

2.5.1.1 Ultraschallmethode

Bei der Ultraschallmethode wurden 10 ml der MLV-Liposomendispersion in einem Beschallungsgefäß (25 mm x 80 mm) analog Mentrup [126] mit dem Branson Sonifier B 15 Cell Disruptor bis zur Entstehung von SUV-Liposomen beschallt.

Die Beschallungsparameter waren:

Schallstab	½ Zoll
Beschallungsdauer	20 min.
Beschallungsart	gepulst
Duty Cycle	70 %
Output control	8
Temperierungsbad	50 °C

Zur Entfernung von Metallpartikeln wurde die abgekühlte Liposomendispersion durch einen 0,2 µm Polycarbonatfilter filtriert.

2.5.1.2 Extrusionsmethode

Bei der Extrusionsmethode wurde 1 ml der MLV-Liposomendispersion bei 65 °C mit dem vorgewärmten Liposofast[®]-Extruder 21 mal durch eine Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 50 nm bis 200 nm) gedrückt.

2.5.2 Abtrennung von nicht eingeschlossenem 5(6)-Carboxyfluoreszein

Bei den Liposomendispersionen, die CF als Fluoreszenzmarker enthielten, wurde der nicht eingeschlossene CF-Anteil durch Größenausschlußchromatographie abgetrennt. 1 bis 2 ml der Liposomendispersion wurden auf ein mit PBS angeschlämmtes Gelbett aus Sephadex G-50 fine (18 mm x 100 mm) aufgetragen. Als Elutionsmittel diente PBS. Der mittlere resultierende Verdünnungsfaktor betrug 2,5. Die so erhaltenen Liposomendispersionen wurden ggf. zur Proteinkopplung eingesetzt.

2.5.3 Proteinkopplung

Die Kopplung von SATA-modifiziertem Albumin bzw. kationisiertem Albumin an Liposomen erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde das Protein durch eine Inkubation von 30 min. mit 0,1 N Hydroxylamin aktiviert (10 µl Hydroxylamin-Lösung pro 100 µl Protein-Lösung). Anschließend wurde durch Zugabe der Liposomendispersion die Kopplungsreaktion eingeleitet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 1.12 B (Seite 22) dargestellt; eine Aufstellung der jeweils eingesetzten Mengen findet sich in Tabelle 3.15 (Seite 94).

2.5.4 Abtrennung von ungebundenem Protein

Die nicht gebundenen Proteinmoleküle wurden von den Protein-Liposomen durch Gelfiltration über eine auf 10 °C gekühlte Sepharose CL-6B Säule (18 mm x 200 mm) abgetrennt. Als Elutionsmittel diente PBS. Die Flussrate von 1,5 ml/min wurde mit einer Peristaltik-Schlauchpumpe eingestellt. Die Probenaufgabe erfolgte durch ein Injektionsventil mit einer 912 µl Probenschleife. Hierbei eluierten die Protein-gekoppelten Liposomen im Gegensatz zu freiem Protein im Ausschlußvolumen (siehe Abbildung 3.34, Seite 96). Der durchschnittliche Verdünnungsfaktor betrug 3.

2.6 Charakterisierung von Liposomen und Protein-Liposomen

2.6.1 Bestimmung der Größenverteilung durch Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Größe der Liposomen und ihre Größenverteilung wurde durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Das verwendete Gerät war der Autosizer IIc, bei dem die beim Durchtritt eines Laserstrahls durch die Teilchendispersion hervorgerufenen zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität im konstanten Winkel von 90° gemessen werden. Die digitalisierten Streulichtdaten wurden an eine Autokorrelationsfunktion

angepaßt. Diese ist eine Summe von e-Funktionen, deren Abfall durch die Diffusionskonstante der Liposomen bestimmt wird. Unter Berücksichtigung der Temperatur und der Viskosität des Dispergierungsmediums kann über die Stokes-Einstein-Beziehung die Liposomengröße berechnet werden. Die Impulsrate wurde für jede Messung durch Verdünnung und Variation der Blendenöffnung optimal eingestellt. Vor Analysenbeginn wurde die Probe im Küvettenhalter auf die Meßtemperatur von 25 °C temperiert.

2.6.2 Lipidkonzentration

Der Lipidgehalt der Liposomendispersionen wurde durch die enzymatische Bestimmung des Phosphatidylcholingehalts analysiert. Hierzu wurde der enzymatische Farbtest MPR 2 verwendet.

Hierbei wird das Phosphatidylcholin durch Phospholipase D in Phosphatidsäuren und Cholin gespalten. Das Cholin wird durch Cholinoxidase mit Sauerstoff und Wasser zu Betain und zwei Mol Wasserstoffperoxid umgesetzt. Aus diesem Wasserstoffperoxid entsteht mit Phenol und 4-Aminophenazon unter Einwirkung von Phenoloxidase der chinoide Farbstoff 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon. Aus der Phosphatidylcholinbestimmung wurde der Phospholipidgehalt unter der Annahme berechnet, dass das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Gesamtlipid während der Herstellung konstant blieb. Zur Durchführung der Bestimmung wurden 50 µl der Liposomendispersion mit 1 ml Enzymreagenz versetzt, 30 min. bei 37 °C inkubiert und gegen Standard- und Blindwerte bei 546 nm im Spektralphotometer vermessen.

2.6.3 5(6)-Carboxyfluoreszein-Gehalt

Der Gehalt von liposomal eingeschlossenem CF wurde spektralfluorimetrisch analysiert. Dazu wurde eine Probe der jeweiligen Liposomendispersion mit einem Überschuß an 1 % Triton[®] X-100 in PBS versetzt und 60 min. bei 65 °C inkubiert. Das so freigesetzte CF wurde im Fluorimeter gegen Blind- und Standardwerte, die ebenfalls Triton[®] X-100 enthielten, bei einer Excitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen.

2.6.4 Proteingehalt

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte wie die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von BCECs (siehe 2.3.5.4) mit dem Biorad-Proteinassay nach der Methode von Bradford [26]. Je 100 µl der Liposomendispersion wurden mit 1 ml des 1:5 mit Wasser verdünnten Proteinassay-Konzentrats vermischt und nach 5 min. bei 595 nm spektralphotometrisch gegen einen Blindwert vermessen. Als Standard dienten Verdünnungen einer Stammlösung des jeweiligen Proteins. Der Proteingehalt der Liposomendispersion wurde in µg Protein pro µmol Lipid berechnet. Als weitere, anschaulichere Größe wurde die Zahl der Proteinmoleküle pro Liposom näherungsweise berechnet:

$$A_{Liposom} = 4\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 + 4\pi \left(\frac{d}{2} - a \right)^2 \quad (7)$$

$$\overline{A}_{Lipide} = A_{PC} \times \frac{n_{PC}}{n_{gesamt}} + A_{CH} \times \frac{n_{CH}}{n_{gesamt}} \quad (8)$$

$$N_{Lipide / Liposom} = \frac{A_{Liposom}}{\overline{A}_{Lipide}} \quad (9)$$

$$n_{Lipide / Liposom} = \frac{N_{Lipide / Liposom}}{N_A} \quad (10)$$

$$C_{Liposom} = \frac{C_{gesamt}}{n_{Lipide / Liposom}} \quad (11)$$

$$C_{Protein} = \frac{C_m(Protein)}{M_{Protein}} \times N_A \quad (12)$$

$$N_{Protein/Liposom} = \frac{C_{Protein}}{C_{Liposom}} \quad (13)$$

mit:

$A_{Liposom}$	Summe von innerer und äußerer Oberfläche eines Liposoms	$[\text{nm}^2]$
d	Liposomendurchmesser	$[\text{nm}]$
a	Dicke des Phospholipid-Bilayers	47 nm
\overline{A}_{Lipide}	Durchschnittliche Fläche der Kopfgruppe eines Lipidmoleküls	$[\text{nm}^2]$
A_{PC}	Fläche der Kopfgruppe von PC	$0,42 \text{ nm}^2$ [139]
A_{CH}	Fläche der Kopfgruppe von CH	$0,19 \text{ nm}^2$ [73]
n_{PC} / n_{gesamt}	Stoffmengenanteil PC an Gesamtlipid ⁴	
n_{CH} / n_{gesamt}	Stoffmengenanteil CH an Gesamtlipid	
$N_{Lipide/Liposom}$	Lipidmoleküle pro Liposom	
$n_{Lipide/Liposom}$	Lipidstoffmenge pro Liposom	$[\text{nmol}]$
$C_{Liposom}$	Liposomen pro Volumen	$[\text{ml}^{-1}]$
C_{gesamt}	Gesamt-Lipidkonzentration	$[\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}]$
$C_{Protein}$	Proteinmoleküle pro Volumen	$[\text{ml}^{-1}]$
$C_m(Protein)$	Proteinkonzentration	$[\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}]$
$N_{Protein/Liposom}$	Proteinmoleküle pro Liposom	

⁴ Der Stoffmengenanteil an weiteren Lipidkomponenten wurde zur Vereinfachung dem PC-Anteil zugeschlagen und nicht gesondert berücksichtigt.

2.6.5 Liposomenstabilität

Zur Untersuchung der Lagerungsstabilität von BSA- und CBSA-gekoppelten Liposomen wurde die jeweilige Liposomendispersion vor Abtrennung des nicht gebundenen Proteins bei 4 °C eingelagert. Pro Woche wurde ein Teil der eingelagerten Dispersion entnommen und von nicht gebundenem bzw. abgespaltenem Protein getrennt (vgl. 2.5.4). Anschließend wurden Liposomengröße, Lipidgehalt, CF-Gehalt und Proteingehalt der Liposomen analysiert (vgl. 2.6.1 bis 2.6.4).

2.6.6 Zeta-Potenzial

Das Zeta-Potenzial wurde mittels Laser-Doppler-Anemometrie mit dem Malvern Zetasizer 3000 HS bestimmt. Die im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnten Liposomendispersionen wurden nach weiterer 1:1 Verdünnung in einem Phosphatpuffer (50 µM Phosphat; pH 7,4) in die Durchflusszelle appliziert und bei einer Frequenz von 250 Hz vermessen.

2.7 Untersuchung der Wechselwirkung von Protein-konjugierten Liposomen mit der Blut-Hirn Schranke *in vitro*

2.7.1 Aufnahme-Experimente mit BCECs und Gehirn-Kapillaren

2.7.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Zellen wurden BCECs auf Objektträgerkammern (8 Kammern pro Objektträger) kultiviert. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit je 200 µl TP gewaschen und für 20 min. vorinkubiert. Danach wurde mit den in TP verdünnten Liposomen (je 100 µl) inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit (0 bis 180 min.) wurden die Zellen viermal mit 4 °C kaltem TP gewaschen und der Kammeraufsatz vorsichtig vom Objektträger entfernt. Überschüssiger TP wurde entfernt und die Zellen wurden mit dem Einschlussmedium Vectashield® benetzt. Unmittelbar nach dem Aufsetzen des Deckglases wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop (vgl. 2.2.1) betrachtet.

2.7.1.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokalmikroskopische Untersuchung der Interaktionen zwischen Liposomen und kultivierten Zellen wurden BCECs auf Deckglaskammern (2 Kammern pro Glas) kultiviert. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit je 1 ml TP gewaschen und für 20 min. vorinkubiert. Danach wurde mit den in TP verdünnten Liposomen (je 250 µl) inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit wurden die Zellen mit 4 °C kaltem TP gewaschen und direkt mit dem

konfokalen Mikroskop betrachtet. Für Experimente mit isolierten Gehirn-Kapillaren wurden diese in TP suspendiert, auf 37 °C temperiert und mit Liposomen versetzt, so dass sich in der Suspension die gewünschte Lipidkonzentration ergab. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit wurde die Kapillar-Suspension durch mehrmaliges Zentrifugieren (200 g, 5 min.) und resuspendieren in 4 °C kaltem TP gewaschen und anschließend auf einen Objektträger zentrifugiert (Zentrifuge mit Zytocentrifugations-Einsätzen; 500 g, 5 min.). Die Kapillaren wurden mit dem Eindeckmedium Vectashield[®] benetzt, mit einem Deckglas bedeckt und mit dem konfokalen Mikroskop betrachtet.

2.7.1.3 Fluoreszenzassays

Zur fluorimetrischen Quantifizierung der Aufnahme von Liposomen wurden BCECs in Kulturplatten mit 96 Vertiefungen kultiviert. Hierbei blieben die Randvertiefungen frei, so dass jeweils nur 60 Vertiefungen genutzt wurden (vgl. 3.2.2.3). Die Versuche wurden 1 bis 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden dreimal mit je 200 µl TP gewaschen und für 20 min. vorinkubiert. Teilweise enthielt die Vorinkubationslösung Endozytose-Hemmstoffe bzw. Proteinzusätze. Danach wurde mit den in TP verdünnten Liposomen (je 100 µl) inkubiert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen viermal mit 4 °C kaltem TP gewaschen, mit je 200 µl 0,5 % Triton[®] X-100 in TP für 1 h bei 65 °C lysiert und die Fluoreszenz in den Platten mit dem Fluoroskan II gemessen.

Eine Kalibrierung der Messmethode wurde durchgeführt, indem verschiedene Verdünnungen der Liposomen in TP (jeweils 100 µl) in eine Platte pipettiert und nach Zugabe von 100 µl 1 % Triton[®] X-100 in TP für 1 h bei 65 °C lysiert wurden. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden mit dem liposomalen CF und nach Berücksichtigung des eingeschlossenen CF-Volumens (Tabelle 3.14) mit der Lipidmenge korreliert (vgl. 3.3.5.1).

Bei einigen Experimenten wurde zusätzlich ein Waschschriff mit einer sauren Waschlösung (SP) durchgeführt [65]. Hierbei wurden die Zellen nach zwei Waschschriffen mit 4 °C TP für 6 min. auf Eis mit jeweils 100 µl 4 °C SP inkubiert und anschließend noch dreimal mit 4 °C TP gespült, bevor die Zellen wie oben beschrieben lysiert und vermessen wurden.

2.7.2 Transport durch BCECs

Für Transport-Experimente mit Liposomen wurden BCECs auf 1 cm² grossen Transwell[®]-clear-Filtereinsätzen in Platten mit 12 Vertiefungen kultiviert. Die Polyester-Filter wiesen eine Porenweite von 0,4 µm auf. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst dreimal mit 37 °C warmen TP gewaschen und 20 min. bei 37 °C im Trockenschrank vorinkubiert. Das Volumen auf der apikalen Zellseite (Donorkompartiment) betrug hierbei 0,5 ml; auf der basolateralen Seite

(Akzeptorkompartiment) wurde 1 ml eingesetzt. Nach der Vorinkubation wurde der TP aus beiden Kompartimenten abgesaugt und basolateral durch frischen TP sowie apikal durch mit TP verdünnte Liposomen ersetzt. Nun wurden die Zellkulturplatten bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert und dabei durch einen Kreisschüttler (3 mm Orbit) mit 500 upm agitiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben von apikal 50 µl und basolateral 100 µl entnommen und das Volumen in beiden Kompartimenten mit auf 37 °C vorgewärmtem TP ergänzt. Die entnommenen Proben wurden direkt oder nach Verdünnung mit TP im Fluoroskan II vermessen. Zur Auswertung wurde nach Korrektur der gemessenen Fluoreszenzen (vgl. 2.3.5.6) die prozentuale Transportrate berechnet. Ebenfalls berechnet wurde zu jedem Zeitpunkt die Gesamtfluoreszenz in apikalen und basolateralen Kompartimenten.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Kultivierte Endothelzellen aus Gehirnkapillaren des Schweins als *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke

3.1.1 Isolierung von BCECs

Für die Isolierung von Kapillar-Endothelzellen aus Schweinehirn wurde soweit wie möglich nur graue Substanz verwendet, da das in der weißen Substanz enthaltene Myelin die Isolierung erschwert [103]. Besonderer Wert wurde auf die sorgfältige Entfernung der Hirnhäute gelegt, um eine Verunreinigung der BCECs mit Endothelzellen der Gefäße, die die Hirnhäute durchziehen, zu vermeiden. Bei der Auswahl der Isolierungsmethode wurde die Verwendung einer enzymatischen Methode einem rein mechanischen Verfahren vorgezogen, da so eine bessere Abtrennung benachbarter Zellen von den Kapillaren gegeben ist. Sämtliche Isolierungsschritte erfolgten in einem Medium, das alle für die Versorgung der Zellen essenziellen Nährstoffe enthielt.

Nach dem manuellen Entfernen von Hirnhäuten und weißer Substanz wurde das verbleibende Hirngewebe einer ersten enzymatischen Behandlung mit der neutralen Protease Dispase unterzogen. Die so vom umgebenden Hirngewebe (Neuronen und Gliazellen) gelösten Kapillarfragmente wurden durch Zentrifugation in einer Dextranlösung von diesem getrennt. Die Dichte der Dextranlösung lag zwischen der Dichte des Hirngewebes und der Dichte der Kapillaren, so dass das lipidreiche Hirngewebe flotierte und die Kapillaren im Pellet verblieben.

Um die Kapillarfragmente von Perizyten und Astrozytenzellmembranen zu befreien, wurde ein zweiter enzymatischer Schritt durchgeführt. Da hierbei ein teilweiser Abbau der collagenreichen Basalmembran erforderlich ist, wurde ein Gemisch aus Dispase und Collagenase verwendet. Die Abtrennung der Endothelzellen erfolgte anschließend durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation in Percoll. Percoll ist ein inertes, untoxisches Kolloid aus Siliziumdioxid und Polyvinylpyrrolidon, das eine isopyknische Trennung von Zellen erlaubt, ohne ihre Morphologie und Vitalität zu beeinträchtigen.

Die BCECs fanden sich einzeln und in Zellclustern nach der Zentrifugation in der mittleren Bande. Die flotierende Bande bestand aus überwiegend avitalem Material; in der unteren Bande befanden sich Erythrozyten (Abbildung 3.1). Die Dichte der BCECs wurde anhand von Vergleichen mit ebenfalls im Percollgradienten zentrifugierten farbigen Markerpartikeln zu 1,03 bis 1,05 g/ml bestimmt. Die mit Trypanblau überprüfte Vitalität der Endothelzellen lag

durchweg bei über 90 %. Insgesamt konnten aus sechs Schweinehirnen zwischen 100 Mio. und 200 Mio. BCECs isoliert werden.

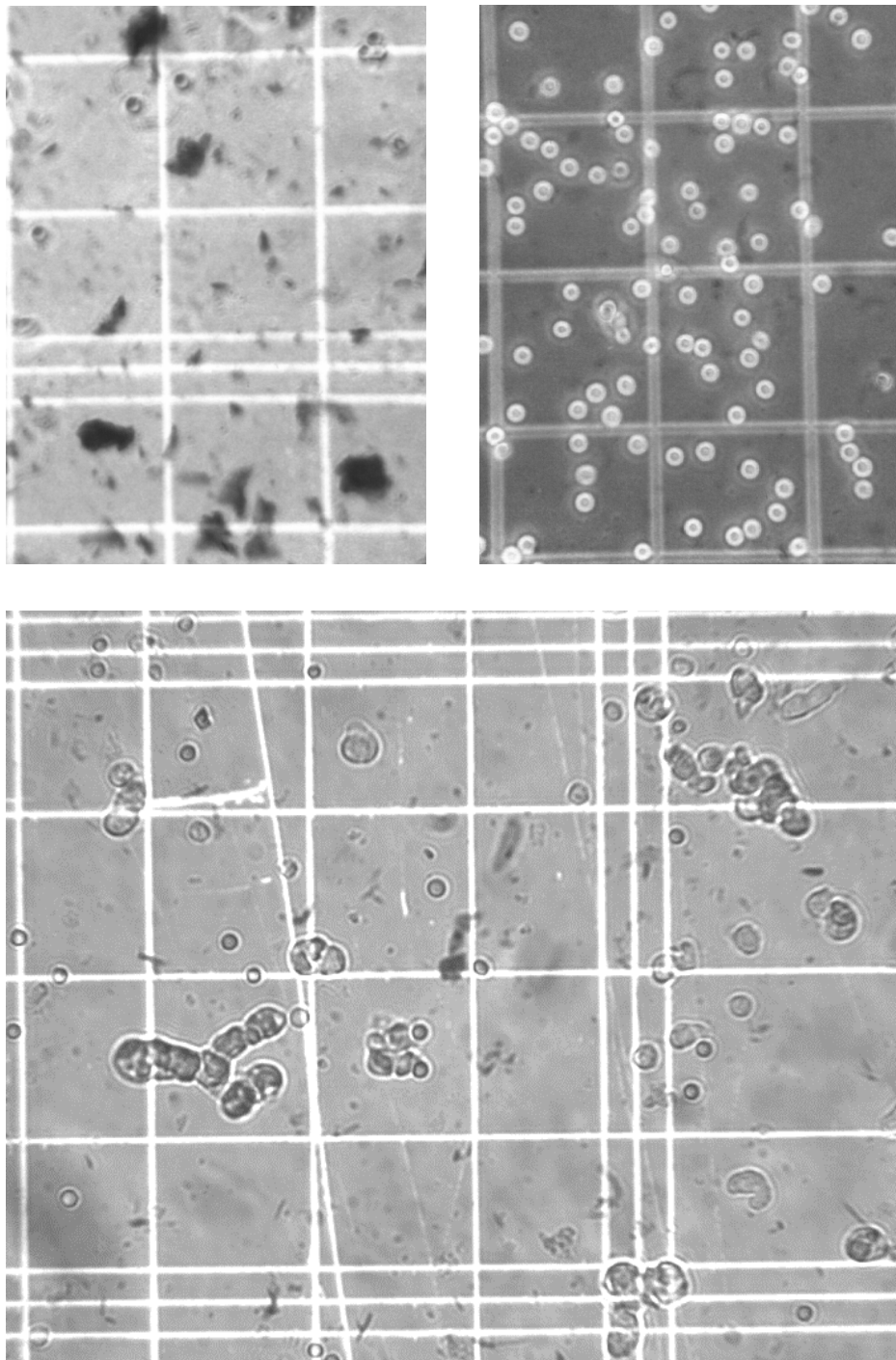


Abbildung 3.1: Fraktionen der Percoll-Zentrifugation in der Neubauer-Zählkammer (Fläche eines kleinen Quadrates $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$) nach Trypanblau-Färbung; **oben links:** flotierende Fraktion; **oben rechts:** untere Bande, Erythrozyten; **unten:** mittlere Bande, BCECs

3.1.2 Kultivierung von BCECs

Die Kultivierung von BCECs erfolgte mit einer Kombination aus zwei verschiedenen Medien (MEM und F-12 Ham; je 45 %) und 10 % Pferdeserum, die sich für diesen Zelltyp bewährt hat [11, 103]. Die Aussaat auf für die Zellkultur vorbehandelte und mit Collagen sowie Fibronectin beschichtete Kunststoffflächen in einer Zelldichte von 100.000 Zellen pro cm^2 führte nach 5 bis 7 Tagen zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers (Abbildung 3.2); bei der Verwendung von Kulturflächen aus Glas war eine zusätzliche Beschichtung mit Poly-D-Lysin notwendig, um eine dauerhafte Anheftung der Zellen zu ermöglichen.

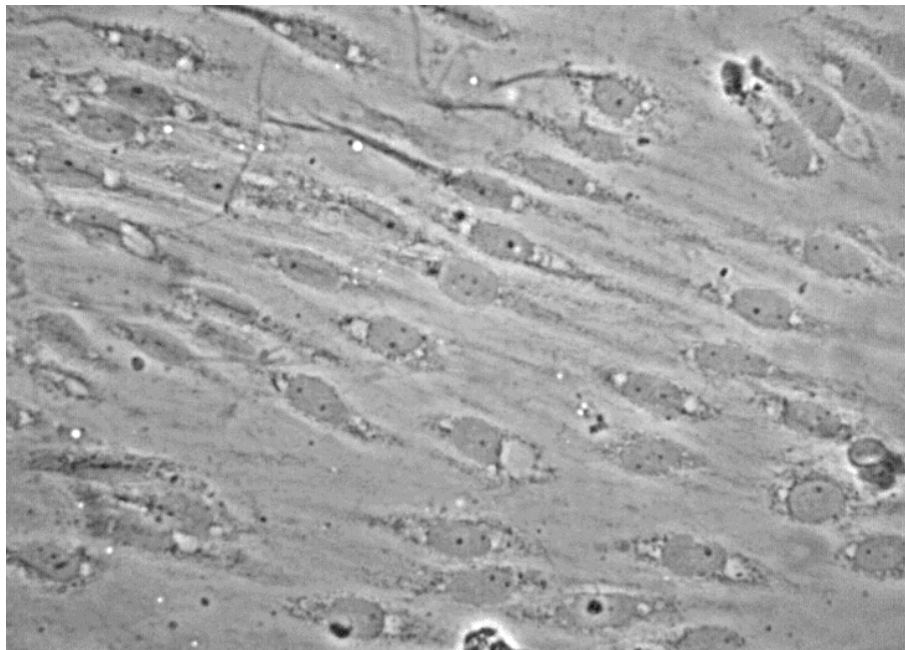


Abbildung 3.2: Konfluenten Monolayer aus kultivierten BCECs nach 7 Tagen in Kultur; fixiert mit Methanol ($250\ \mu\text{m} \times 180\ \mu\text{m}$)

Das Wachstum der BCECs ging dabei von Zellclustern aus, die sich innerhalb der ersten 24 Stunden auf den Boden der Kulturgefäße abgesetzt hatten. Nach zwei Tagen waren die ersten Monolayer-„Inseln“ zu beobachten, die schließlich in den darauf folgenden Tagen zu einer konfluenten Schicht zusammenwuchsen. In Kultur liessen die Zellen eine typische, ausgeprägt spindelförmige Morphologie erkennen. Endothelzellen peripheren Ursprungs weisen dagegen zumeist eine kuboidale Struktur auf.

In der Wachstumsphase der Zellmonolayer bis zur Konfluenz war keine Kontamination mit anderen Zelltypen erkennen; allerdings wurden die BCECs nach ca. 10 Tagen in Kultur allmählich von einer zweiten Zellschicht überwachsen; hierbei handelte es sich um Perizyten [196]. Da die Experimente mit den BCECs schon kurz nach Erreichen der Konfluenz durchgeführt wurden, störte diese Kontamination nicht.

3.1.3 Charakterisierung von BCECs

Für die Charakterisierung von kultivierten BCECs wurde das Vorkommen der Endothelzell-spezifischen Proteine Vimentin und von Willebrand-Faktor (vWF) untersucht. Darüber hinaus wurde die Aktivität der γ -Glutamyl-Transferase in BCECs unter verschiedenen Kulturbedingungen bestimmt und mit Hirnhomogenat bzw. frisch isolierten Kapillaren verglichen.

3.1.3.1 Nachweis von Vimentin

Vimentin ist ein intermediäres Proteinfilament des Zytoskeletts. Es findet sich vorwiegend in Zellen, die einen großen Druck aushalten müssen bzw. permanent einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wie dies bei Endothel- und Epithelzellen der Fall ist [2].

Vimentin wurde in kultivierten BCECs mit einem indirekten immunhistochemischen Verfahren nachgewiesen. Nach Fixierung in Methanol wurden die Zellen zunächst mit Anti-Vimentin inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die BCECs wurde durch Behandlung mit einem FITC-markiertem Zweitantikörper visualisiert (vgl. 2.3.5.2). Abbildung 3.3 zeigt das fluoreszenzmikroskopische Bild eines so behandelten Präparates.

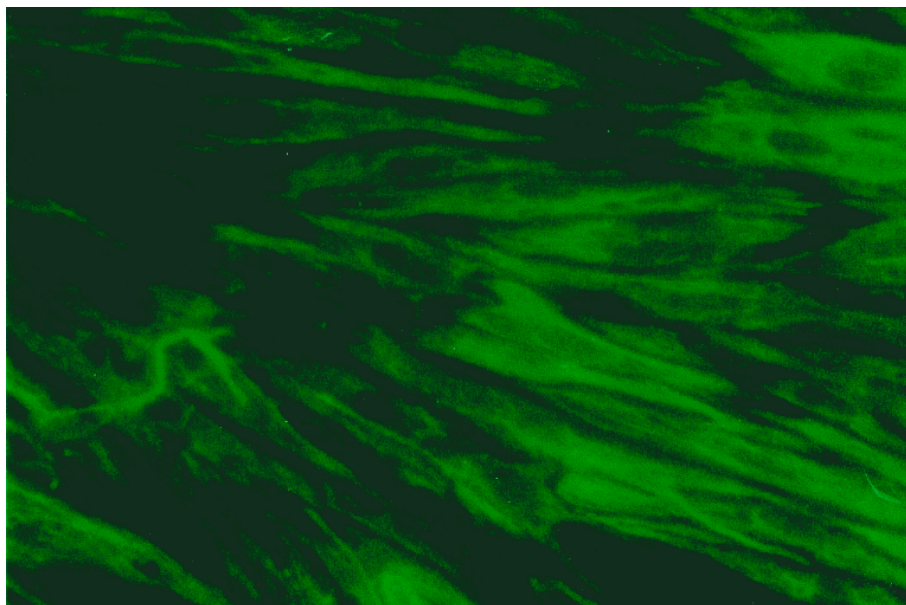


Abbildung 3.3: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin; fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von BCECs (250 μm \times 165 μm)

Die Zellumrisse sind in der Fluoreszenzaufnahme deutlich zu erkennen. Die Zellkerne zeigen keine Reaktion mit dem Antikörper und sind von der Fluoreszenzfärbung ausgespart. Die dunklen Stellen zwischen den einzelnen Zellen sind auf ein Schrumpfen durch die Methanol-Fixierung zurückzuführen. Somit konnte gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen das für Endothelzellen charakteristische Vimentin enthalten.

3.1.3.2 Nachweis des von Willebrand-Faktors

Der vWF ist ein Glykoprotein und Teil des Faktor VIII-Komplexes der Blutgerinnungskaskade. Er vermittelt bei der Blutungsstillung die Aggregation von Thrombozyten am verletzten Gefäßendothel und ist hauptsächlich in Endothelzellen lokalisiert [88]. Das Vorkommen von vWF wurde ebenfalls mit einem indirekten immunhistochemischen Verfahren (Anti-vWF und FITC-markierter Zweitantikörper) nachgewiesen (vgl. 2.3.5.2). Die Fixierung der Zellen wurde dabei mit einem Gemisch aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd durchgeführt, um ein starkes Schrumpfen der Zellen zu verhindern. Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mit Propidiumiodid gegengefärbt (Abbildung 3.4).

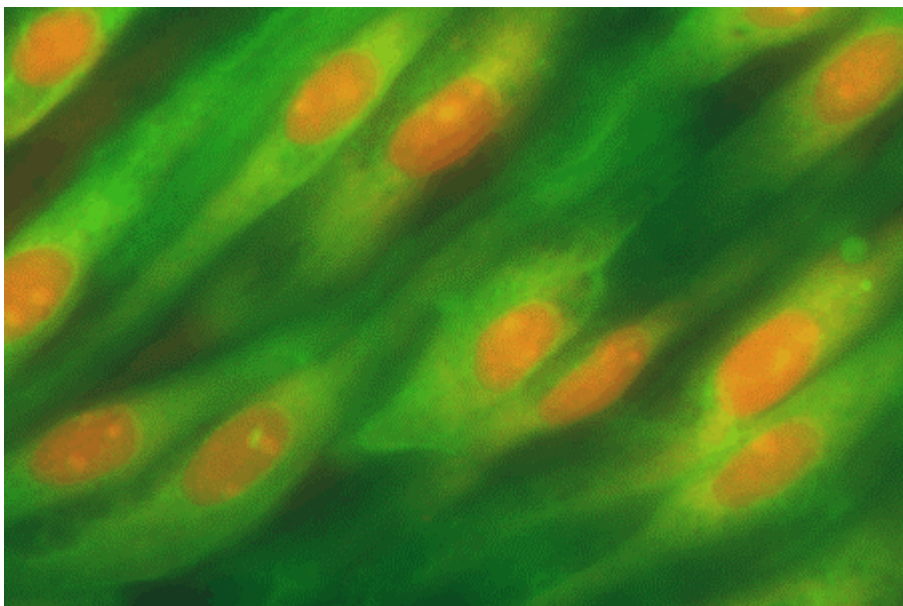


Abbildung 3.4: Immunhistochemischer Nachweis des von Willebrand-Faktors; fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von BCECs ($150\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$)

Auch hier sind die Zellumrisse deutlich zu erkennen. Die Zellkerne treten durch die Behandlung mit Propidiumiodid deutlich rotfluoreszierend hervor und zeigen keine Interaktion mit dem Antikörper. Die Grünfluoreszenz ist netzartig über den gesamten Zellbereich ausgebreitet; teilweise sind vesikelförmige Strukturen zu erkennen. Hierbei könnte es sich um Weibel-Palade-Körperchen handeln, in denen der vWF gespeichert wird. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen auch das für Endothelzellen charakteristische Markerprotein vWF enthalten.

3.1.3.3 Aktivität der γ -Glutamyltransferase

Die γ -Glutamyl-Transferase (GGT) gilt als wichtiges Leitenzym für die BHS [1]. Es überträgt γ -Glutamyl-Gruppen auf verschiedene Akzeptoren und kommt in Zellen vor, die *tight junctions* aufweisen. Die Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms erfolgte mit dem Substrat γ -Glutamyl-p-nitroanilid [145], als Akzeptor fungierte Glycylglycine (vgl. 2.3.5.3). Die verwendete Methode zeichnet sich durch eine gute Linearität aus, wie durch Untersuchung verschiedener Verdünnungen einer Suspension von kultivierten BCECs gezeigt werden konnte (Abbildung 3.5).

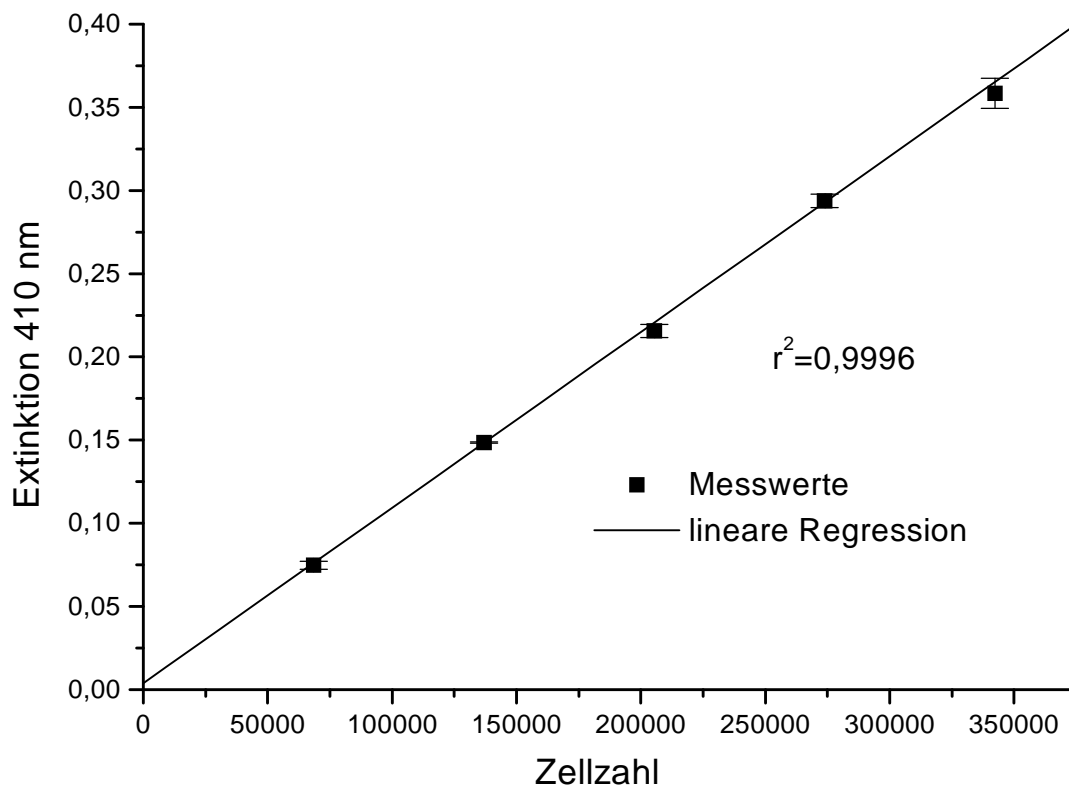


Abbildung 3.5: Bestimmung der Aktivität von γ -Glutamyl-Transferase mit verschiedenen Verdünnungen einer Suspension von kultivierten BCECs; Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen

Die Aktivität der GGT nimmt in kultivierten BCECs ab. Diese Abnahme ist abhängig von der Kulturdauer [131]. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch Variation der Kulturbedingungen vermindert werden kann, wurde die GGT-Aktivität von BCECs, die in verschiedenen Medien kultiviert wurden, bestimmt. Dabei wurde neben normalem Medium (EM) und ACM ein kommerziell erhältliches, speziell für Endothelzellen konzipiertes serumfreies Medium (SFM) verwendet.

Zusätzlich wurden die Zellen auch mit einer Kombination aus dem cAMP-Analogon CPT-cAMP und dem Phosphodiesterase-Hemmstoff RO-20-1724 behandelt (vgl. 1.2.2.2.3). Als Vergleichswerte wurden die Enzymaktivitäten in frisch isolierten Kapillaren und in Hirnhomogenat bestimmt (Abbildung 3.6).

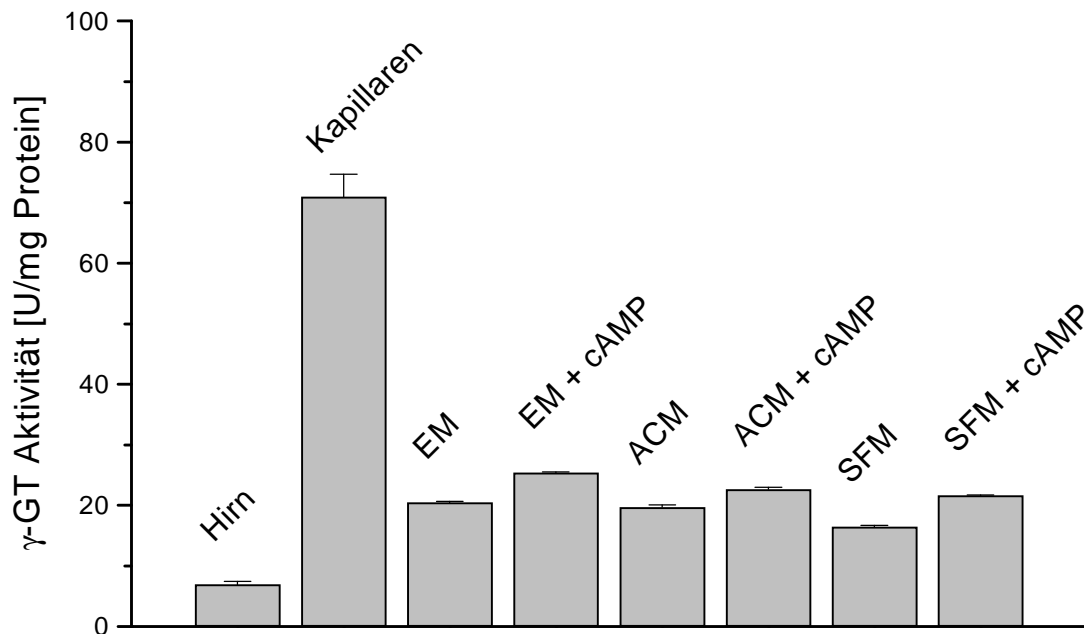


Abbildung 3.6: Aktivität von γ -Glutamyl-Transferase in Hirnhomogenat, Kapillaren und kultivierten BCECs unter verschiedenen Kulturbedingungen nach 8 Tagen in Kultur; Mittelwerte aus jeweils 3 Bestimmungen; Einzelwerte siehe Tabelle 5.1

Die Aktivität der GGT im Hirnhomogenat wurde zu 7 U/mg Protein bestimmt. Ähnliche Werte wurden in Schweinehirn von Kummer [103] gefunden. In frisch isolierten Kapillaren ist die GGT um den Faktor 10 angereichert, die Aktivität beträgt ca. 70 U/mg Protein und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie in frisch isolierten BCECs bei Mischek et al. [131]. In kultivierten BCECs nach 7 Tagen Kulturdauer nehmen die Werte auf 16 bis 25 U/mg ab. Dies entspricht etwa einer Aktivität von 6 bis 10 U pro 10^6 Zellen. In beiden Relationen liegen die GGT-Aktivitäten um den Faktor 2 bis 3 höher als bei Mischek et al.

Die Unterschiede in der GGT-Aktivität zwischen den einzelnen Medien liegen in einem Bereich, der auch durch natürliche Schwankungen in biologischen Systemen bedingt sein kann. Tendenziell bewirkt die Kombination aus CPT-cAMP und Phosphodiesterasehemmer bei allen untersuchten Kulturmedien eine leichte Erhöhung des GGT-Levels. Dieser Effekt ist allerdings bei weitem nicht so deutlich ausgeprägt wie z.B. der Einfluss auf den TEER, den Rubin et al. gefunden haben [173]. Mit SFM kultivierte BCECs haben die geringste GGT-Aktivität. Zwischen normalem Medium und ACM ist kein Unterschied zu finden. Insgesamt ist festzustellen, dass die GGT-Aktivität in kultivierten BCECs durch die untersuchten Medientypen nur in geringem Maße beeinflusst wird.

3.1.4 Untersuchung und Optimierung der Dichte von auf Filtern kultivierten BCECs

Ein Ziel dieser Arbeit war es, kultivierte BCECs auf ihre Eignung als voraussagekräftiges Modell für den Transport von Arzneistoffen an der BHS zu untersuchen. Dies geschah ohne Berücksichtigung der Problematik der *in vitro*- / *in vivo*-Korrelation. Da das herausragende Merkmal der BHS die dichte Verbindung der Endothelzellen untereinander und die somit äußerst geringe parazelluläre Permeation ist, wurde zunächst die Permeabilität von fluoreszierenden Substanzen untersucht, die nahezu ausschließlich parazellulär diffundieren. Dabei wurden die Kultur- und sonstigen Bedingungen so modifiziert, dass eine möglichst geringe Permeation dieser Substanzen auftrat. Als weiterer Parameter neben der Permeabilität wurde der TEER untersucht.

3.1.4.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Transport-Experimenten

Alle gemessenen Transportraten zeigten eine gute Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten größer 0,99. Die relativen Standardabweichungen der Transportraten blieben für jede Versuchsgruppe über die Zeit weitgehend konstant und lagen bei den meisten Experimenten im Bereich von 5 % bis 10 %, selten um die 20 % (vgl. Anhang); diese Abweichungen sind hauptsächlich durch die Zellmonolayer bedingt. Die Variabilität des Transports einer Substanz bei verschiedenen Zellaussaaten ist deutlich höher, was einen direkten Vergleich der Permeabilitäten schwierig macht. So streuen alle für CF ermittelten apparenten Permeabilitätskoeffizienten in einem Bereich von $6,7 \times 10^{-6}$ bis $2,5 \times 10^{-5}$ cm/s. Um den Einfluss einzelner Faktoren möglichst unabhängig von diesen nicht kontrollierbaren zellbedingten Schwankungen erfassen zu können, wurden für alle direkt miteinander verglichenen Versuchsgruppen stets die Zellen zusammen ausgesät und alle Experimente am gleichen Tag durchgeführt.

3.1.4.2 Vergleich zwischen Transwell®-Snapwell® und Transwell®-clear Filtereinsätzen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Transport-Experimente mit auf Filtern kultivierten BCECs durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Zunächst wurden die Zellen auf intransparenten Transwell®-Snapwell®-Filtereinsätzen aus Polycarbonat angezüchtet. Die Transport-Experimente wurden nach Erreichen der Konfluenz im Costar-Diffusionskammer-System durchgeführt (vgl. 1.2.2.2.2, 2.3.5.6.1). Hierbei stellten sich bald einige apparaturbedingte Nachteile heraus, wie umständlicher Zusammenbau des Systems, häufige Undichtigkeit der Kammern und die Limitierung auf sechs Filter in einem Kammersystem. Außerdem gestaltete sich die Einstellung eines konstanten, gleichmäßigen Gasflusses in allen Halbzellen mit den insgesamt 12 Ventilen des Kammersystems schwierig. Zudem konnte eine Schädigung des Zellmonolayers beim Zusammenbau des Systems nicht ausgeschlossen werden, da bei der Trennung des mit BCECs bewachsenen Filters vom für die Kultivierung benötigten Halter (vgl. Abbildung 1.8) praktisch immer eine Dehnung des

Filtermaterials zu beobachten war. Ein weiteres Problem war die Intransparenz des Filtermaterials, die eine optische Kontrolle des Zellmonolayers verhinderte. Somit mussten die Zellen zur Beurteilung des Wachstums mit zum gleichen Zeitpunkt in konventionellen Zellkulturplatten ausgesähten BCECs verglichen werden.

Deshalb wurden die Transport-Experimente später direkt in den Kulturplatten durchgeführt (vgl. 2.3.5.6.2). Gleichzeitig wurde das Filtermaterial auf die transparenten Polyestermembranen Transwell®-clear umgestellt. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen beiden Versuchsanordnungen wurde die Diffusion von CF durch die Filter und durch Zellmonolayer in beiden Modellen bestimmt. Die Transportraten sind in Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8, die apparenten Permeabilitätskoeffizienten in Tabelle 3.1 dargestellt.

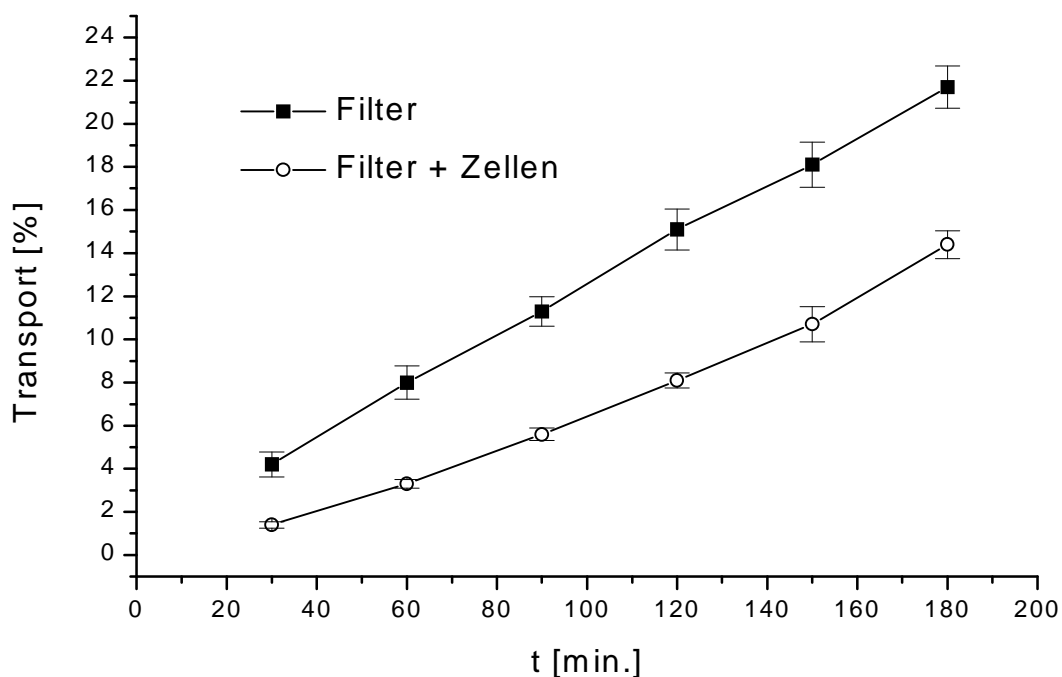


Abbildung 3.7: Transport von CF (1 µg/ml) durch Transwell®-Snapwell®-Filtereinsätze in der Costar-Apparatur (Einzelwerte siehe Tabelle 5.2 und Tabelle 5.3)

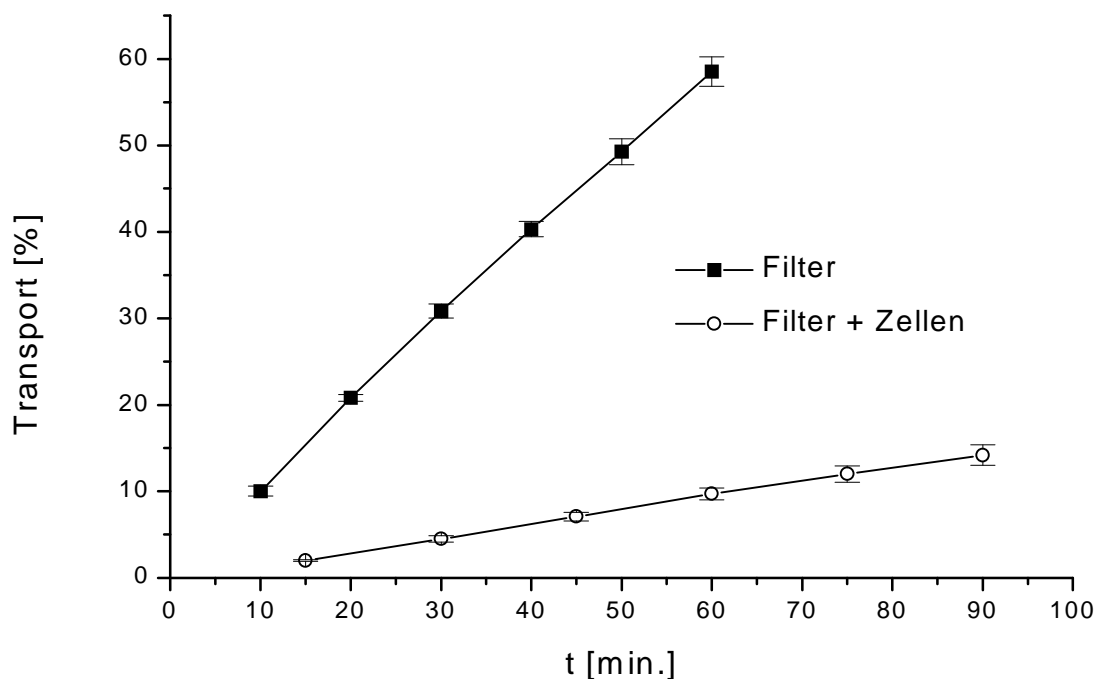


Abbildung 3.8: Transport von CF (1 µg/ml) durch Transwell®-clear Filtereinsätze in Kulturschalen (Einzelwerte siehe Tabelle 5.4 und Tabelle 5.5)

Tabelle 3.1: Apparente Permeabilitätskoeffizienten für die Diffusion von CF im Costar-Diffusionskammer-System (Transwell®-Snapwell®) bzw. direkt in Kulturplatten (Transwell®-clear)

	Transwell®-Snapwell®		Transwell®-clear	
Diffusion von CF durch	P_{app} [cm/s]	relativ	P_{app} [cm/s]	relativ
Filter	$1,71 \times 10^{-5}$	1,4	$8,03 \times 10^{-5}$	5,9
Zellen	$1,26 \times 10^{-5}$	1	$1,36 \times 10^{-5}$	1

Ein direkter Vergleich der Transportraten zwischen den in der Costar-Apparatur und den in Kulturplatten durchgeführten Experimenten ist nicht möglich, da sich die berechneten prozentualen Werte auf die eingesetzte CF-Masse und nicht auf die Ausgangskonzentration beziehen. Der Vergleich der konzentrationsbezogenen Permeabilitätskoeffizienten zeigt nur einen marginalen Unterschied für die Diffusion von CF durch den Zellmonolayer. Interessant dagegen ist die unterschiedliche Permeabilität durch das Filtermaterial allein. Der in der Costar-Apparatur bestimmte P_{app} liegt nur 40 % über dem Wert für den Zellmonolayer, so dass in diesem System der Filter den Hauptdiffusionswiderstand darstellt. In den Kulturplatten dagegen liegt die Permeabilität durch die Filtermembran um den Faktor 6 über den BCECs. Hier stellt die Zellschicht den größten Widerstand der Diffusion dar. Somit ist in diesem System eine differenziertere Beurteilung der Permeabilitäten von Substanzen möglich.

Die beobachteten Effekte können durch die unterschiedliche Versuchsanordnung und das unterschiedliche Filtermaterial bedingt sein. Ein direkter Vergleich der beiden Membrantypen wurde von Yu und Sinko mit Caco 2-Zellen in der Costar-Apparatur durchgeführt [210]. Diese fanden für die Polyester-Membran durchweg geringere Permeabilitäten als für den Polycarbonatfilter, was sich mit der geringeren Zahl an Poren in dem transparenten Material ($4 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ gegenüber $1 \times 10^8 \text{ cm}^{-2}$) erklären lässt. Somit sollte die unterschiedliche Versuchsanordnung für die höhere Permeabilität von CF durch Transwell®-clear Membranen verantwortlich sein. Wahrscheinlich bewirkt das Schütteln der Kulturplatten während der Versuchsdurchführung eine deutlich effektivere Verringerung der Diffusionsschicht vergrößernden *unstirred water layer* als das Belüftungssystem der Costar-Kammer. Als weiteren Nachteil der Costar-Apparatur konnten Yu und Sinko eine deutliche Abhängigkeit der Permeabilitäten vom Gasfluss in diesem System zeigen.

Insgesamt ist also die direkte Verwendung der Transwell®-Kulturplatten dem Costar-System vorzuziehen. Allerdings sollte auch hier besonders in Bezug auf das Schütteln auf konstante Bedingungen (Umdrehungszahl und Orbit des verwendeten Kreisschüttlers) geachtet werden.

3.1.4.3 Einfluss der Molekülgröße auf die Transportrate

Um den Einfluss der Molekülgröße auf die Transportrate zu untersuchen, wurden Transport-Experimente mit CF und verschiedenen FITC-Dextranen durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass einerseits eine sichere Detektion der Fluoreszenz möglich war und andererseits kein Quenching durch zu hohe Konzentrationen in den Proben auftreten konnte. Tabelle 3.2 listet die Molekülgrößen und Permeabilitätskoeffizienten auf; die Transportraten sind in Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10 dargestellt. Abbildung 3.11 zeigt die Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten von der Molekülgröße.

Tabelle 3.2: Transport von CF und FITC-Dextranen durch BCECs: eingesetzte Konzentrationen, apparente Permeabilitätskoeffizienten und Stokes-Einsteinsche Molekülradien

Substanz	c [µg/ml]	M _r [Da]	Molekülradius [nm]	P _{app} [cm/s]
CF	1	390	0,7	$1,35 \times 10^{-5}$
FD-4	100	4000	1,4	$7,89 \times 10^{-6}$
FD-10	100	10000	2,2	$4,22 \times 10^{-6}$
FD-20	200	20000	3,0	$1,73 \times 10^{-6}$
FD-40	200	40000	4,5	$1,47 \times 10^{-6}$
FD-70	500	70000	6,0	$1,16 \times 10^{-6}$

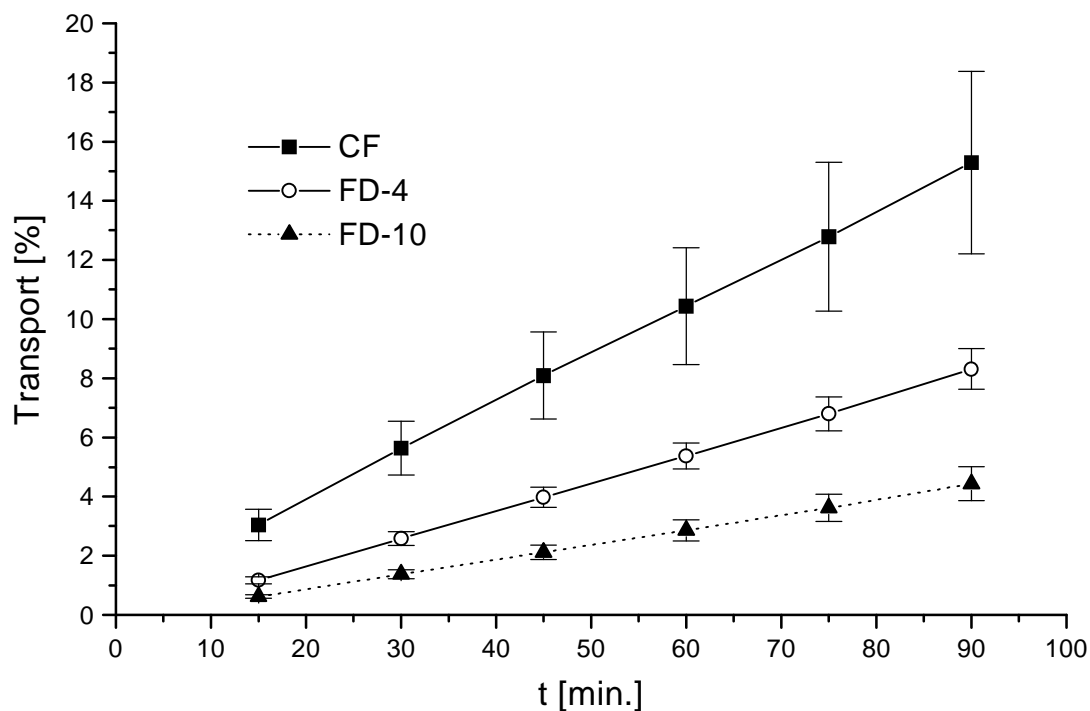


Abbildung 3.9: Transport von CF, FD-4 und FD-10 durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.6 bis Tabelle 5.8)

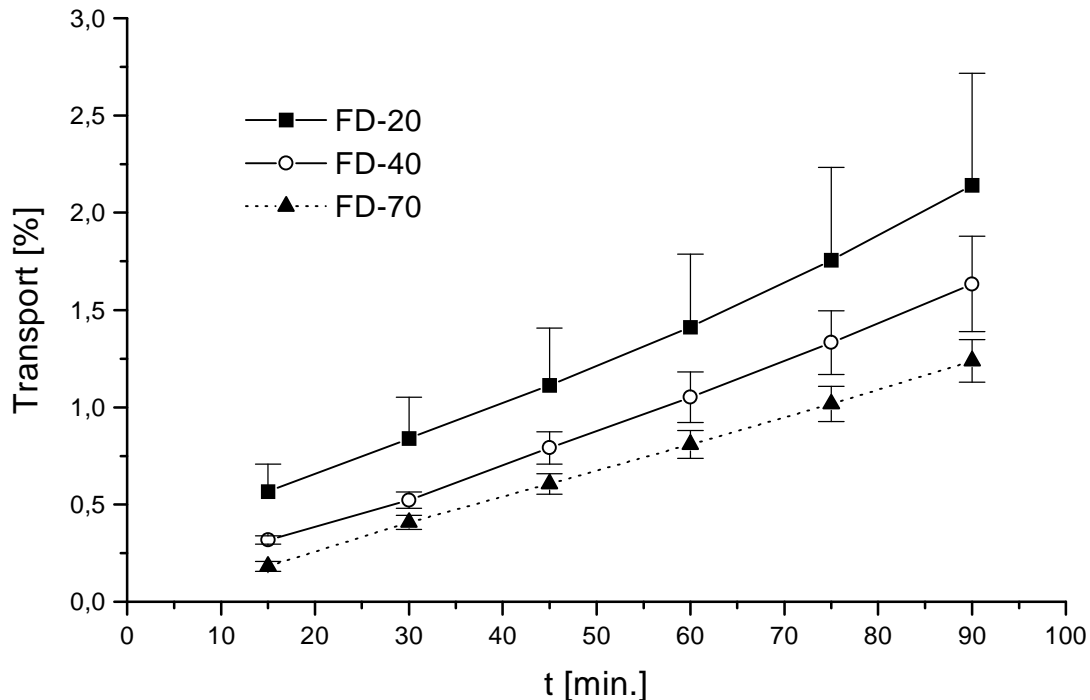


Abbildung 3.10: Transport von FD-20, FD-40 und FD-70 durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.9 bis Tabelle 5.11)

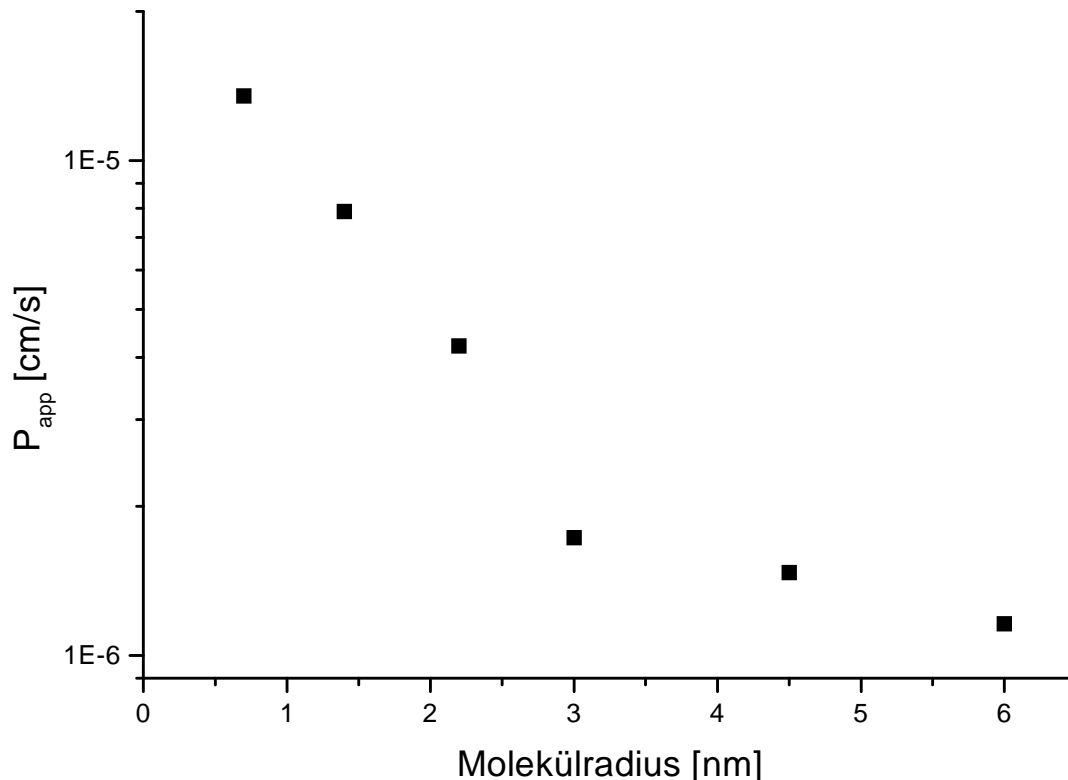


Abbildung 3.11: Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten vom Molekülradius ausgewählter Parazellulärmarker

Erwartungsgemäß nimmt die Transportrate mit zunehmender Molekülgröße ab. Von CF bis zu FD-20 ist jeweils eine recht hohe Abnahme zu beobachten, von FD-20 bis FD-70 nimmt die Permeabilität deutlich langsamer ab. Einen Verlauf mit ähnlichen Relationen zwischen verschiedenen FITC-Dextranen finden auch van Bree et al. [201] sowie Raessi und Audus [166]. Insgesamt wird deutlich, dass mit dem Zellkulturmodell eine gute Differenzierung im Transportverhalten parazellulär diffundierender Substanzen möglich ist.

3.1.4.4 Einfluss von serumfreiem Medium und Hydrocortison auf die Zelldichte

Die Verwendung von Serum als Medienzusatz ist umstritten. Einerseits enthält es viele für ein gutes Zellwachstum notwendige Faktoren, andererseits ist die stark schwankende Zusammensetzung für ein reproduzierbares Ergebnis der Zellkultivierung von Nachteil. Um zu konstant dichten Zellmonolayern zu gelangen, kann es von Vorteil sein, dem Medium bestimmte Wachstumsfaktoren zuzusetzen. In der Literatur sind hierzu etliche Ansätze zu finden. Hoheisel et al. [79] beschreiben eine deutliche Erhöhung des TEER und eine damit einhergehende Reduktion der Permeabilität des Parazellulärmarkers Sucrose nach Behandlung von BCECs mit Hydrocortison in einem serumfreien Medium. Die Verwendung von serumhaltigem Medium dagegen führte nur zu einer geringen Widerstandserhöhung.

Um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes auch für die hier beschriebenen Zellen festzustellen, wurden die Zellen, wie in [79] beschrieben, nicht direkt auf den Filtern ausgesät, sondern zunächst für drei Tage in Flaschen kultiviert und danach in die Transwell®-clear Kulturschalen umgesetzt. Am Tag nach der Passage wurde teilweise auf EM ohne Serumzusatz umgestellt bzw. Hydrocortison (HC; 550 nM) zugesetzt. Vier Tage später wurden Transport-Experimente mit CF, FD-4 und FD-10 durchgeführt. Tabelle 3.3 zeigt die Permeabilitätskoeffizienten, in Abbildung 3.12 bis Abbildung 3.14 sind die Transportraten und in Tabelle 3.4 die Werte für den TEER dargestellt.

Tabelle 3.3: Einfluss von Serum und Hydrocortison auf die apparenten Permeabilitätskoeffizienten von CF, FD-4 und FD-10

Substanz	P_{app} [cm/s]			
	S+;HC-	S+;HC+	S-;HC+	S-;HC-
CF	$2,31 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$2,36 \times 10^{-5}$	$3,22 \times 10^{-5}$
FD-4	$6,46 \times 10^{-6}$	$5,27 \times 10^{-6}$	$7,64 \times 10^{-6}$	$1,20 \times 10^{-5}$
FD-10	$3,25 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-6}$	$4,93 \times 10^{-6}$	$7,89 \times 10^{-6}$

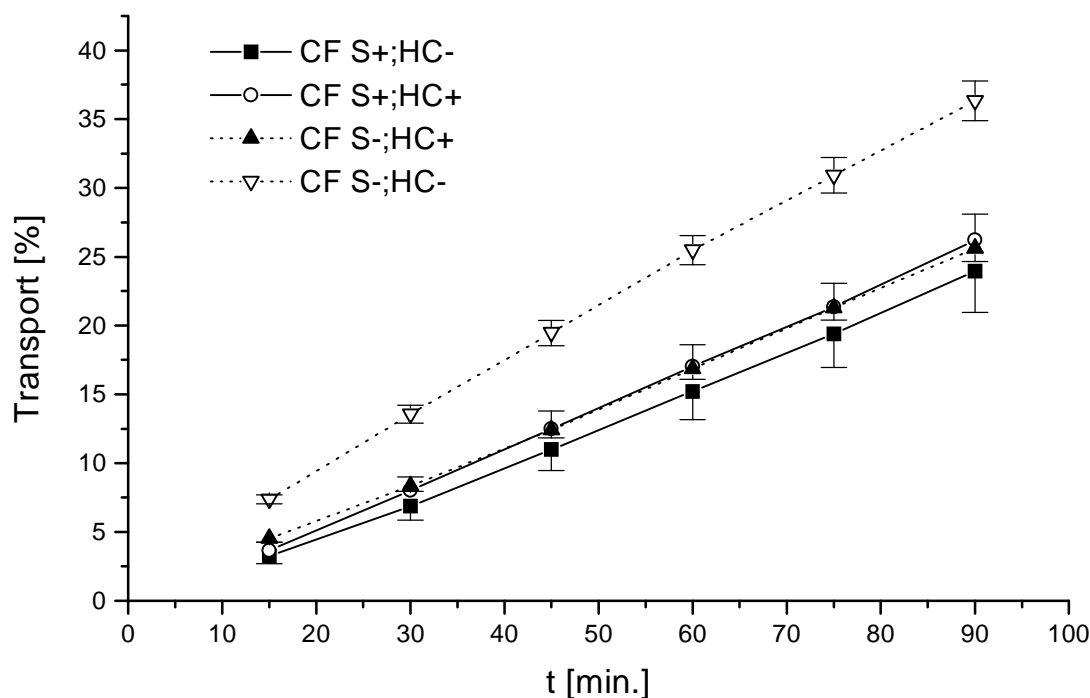


Abbildung 3.12: Einfluss von Serum und Hydrocortison auf den Transport von CF (1 µg/ml) durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.12 bis Tabelle 5.15)

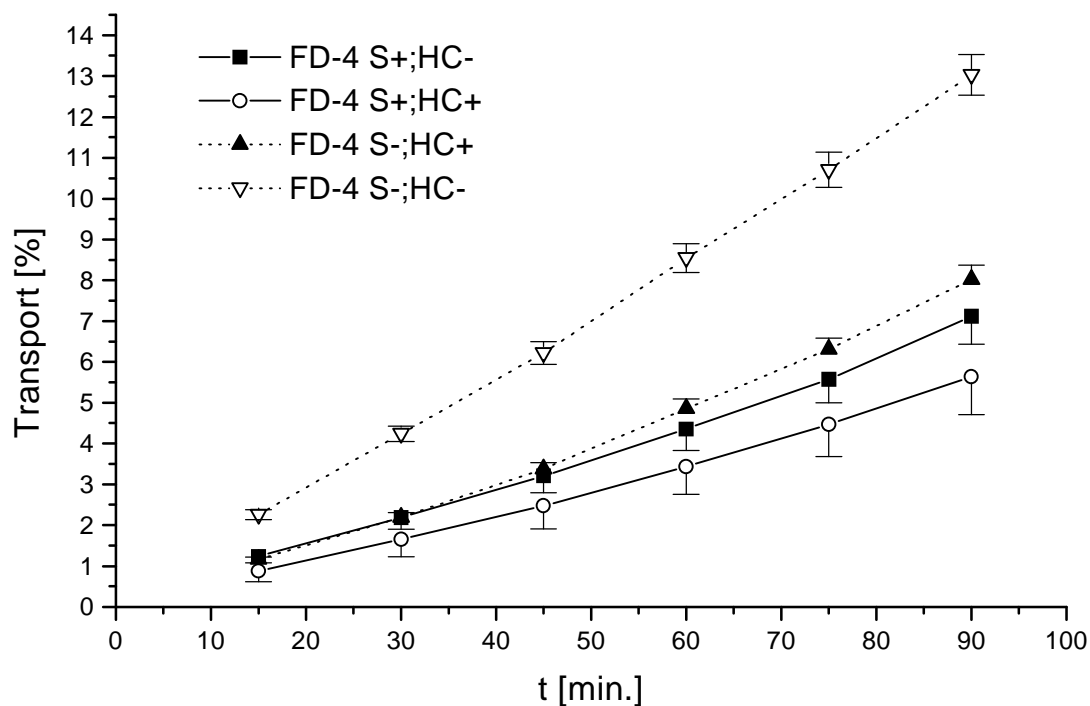


Abbildung 3.13: Einfluss von Serum und Hydrocortison auf den Transport von FD-4 (100 µg/ml) durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.16 bis Tabelle 5.19)

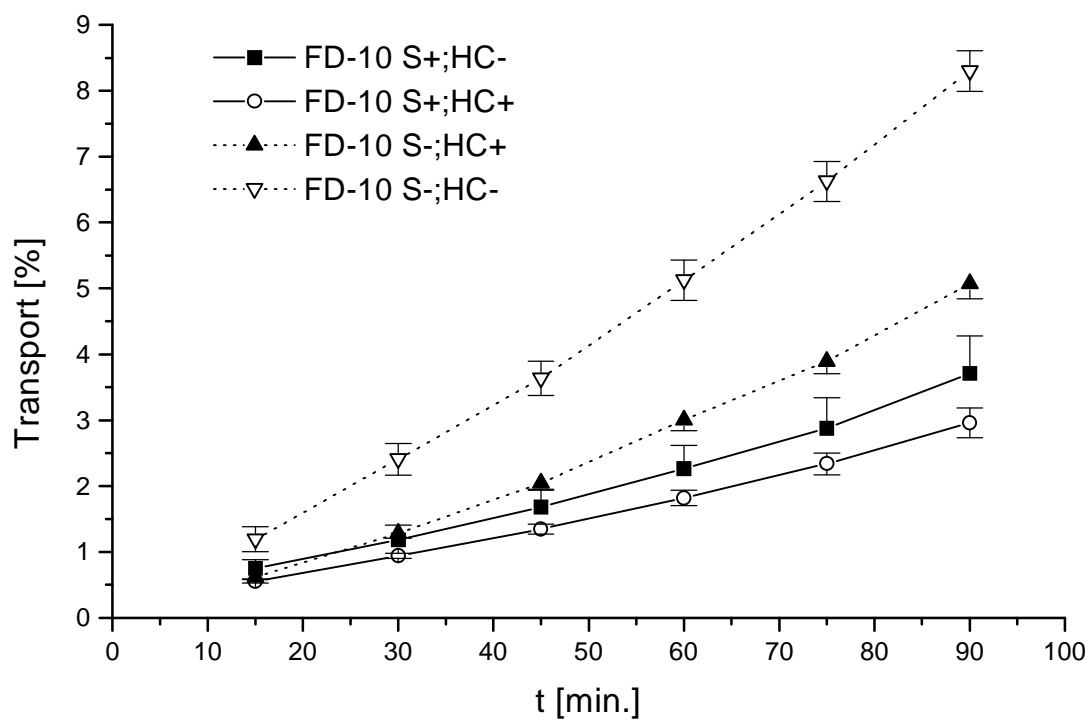


Abbildung 3.14: Einfluss von Serum und Hydrocortison auf den Transport von FD-10 (100 µg/ml) durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.20 bis Tabelle 5.23)

Tabelle 3.4: Einfluss von Serum und Hydrocortison auf den TEER

	TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$]			
	S+;HC-	S+;HC+	S-;HC+	S-;HC-
Mittelwert	59	79	69	40
s	3,9	4,3	8,0	10,3
n	12	12	12	12

Bei allen drei Substanzen sind in den Transportraten und Permeabilitäten der beiden serumhaltigen Gruppen nur geringe Unterschiede festzustellen; die Permeabilitäten der HC-haltigen Gruppe liegen bei FD-4 und FD-10 ca. 20 % unter den Permeabilitäten der HC-freien Gruppe. Hydrocortison hat hier also nur einen geringen Einfluss auf die Dichte des Monolayers. Dagegen zeigen die mit HC behandelten serumfrei kultivierten Zellen deutlich geringere Permeabilitäten als die ohne HC und Serum kultivierten, die bei allen Substanzen dicht bei den serumhaltigen, aber mit zunehmendem Molekulargewicht weiter oberhalb dieser Gruppen liegen. Die Verwendung von serumfreiem Medium bewirkt also insgesamt eine schlechtere Integrität der Monolayer. Hydrocortison ist in der Lage, diesen Effekt teilweise zu kompensieren.

Die transendothelialen Widerstände zeigen für die serumfrei ohne HC kultivierten Zellen die geringsten und für die serumhaltig mit HC kultivierten Zellen die höchsten Werte. Dies stimmt mit den Transport-Experimenten überein. Die Rangfolge der anderen beiden Gruppen ist dagegen vertauscht. Insgesamt sind die TEERs im Vergleich zu anderen Experimenten zu niedrig und die Transportraten zu hoch. Um zu untersuchen, ob dies auf die Passagierung (siehe Seite 71) der Zellen während der Kultivierung zurückzuführen ist, wurden in einem weiteren Ansatz direkt auf Filter ausgesäte Zellen („normal“) mit passagierten Zellen verglichen (Tabelle 3.5, Tabelle 3.6 und Abbildung 3.15).

Tabelle 3.5: Einfluss der Passagierung auf den P_{app} von CF, FD-4 und FD-10

	P_{app} [cm/s]	
Substanz	normal	passagiert
CF	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,22 \times 10^{-5}$
FD-4	$2,89 \times 10^{-6}$	$2,66 \times 10^{-6}$
FD-10	$9,93 \times 10^{-7}$	$1,03 \times 10^{-6}$

Tabelle 3.6: Einfluss der Passagierung auf den TEER

	TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$]	
	normal	passagiert
Mittelwert	102	82
s	6,0	3,4
n	12	12

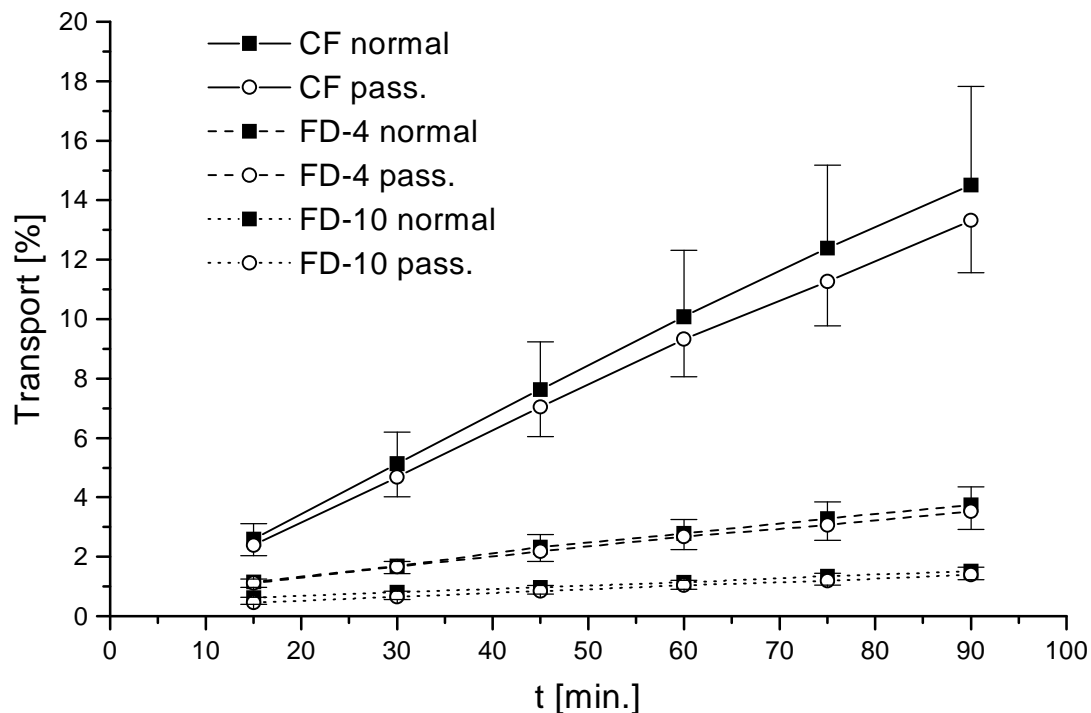


Abbildung 3.15: Einfluss der Passagierung (siehe Seite 71) auf den Transport von CF (1 $\mu\text{g/ml}$), FD-4 (100 $\mu\text{g/ml}$) und FD-10 (100 $\mu\text{g/ml}$) durch BCEC-Monolayer (Einzelwerte siehe Tabelle 5.24 bis Tabelle 5.29)

Die Passagierung hat keinen Einfluss auf die Transportraten der drei Substanzen. Der TEER der passagierten Zellen ist geringfügig kleiner. Somit müssen die oben gemessenen hohen Permeabilitäten durch eine andere Abweichung verursacht worden sein. Als mögliche Ursache kommt hier z.B. die Einstellung einer zu geringen Zelldichte bei der Aussaat auf die Filter in Betracht.

Insgesamt stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu der Arbeit von Hoheisel et al. [79]. Obwohl die dort beschriebenen Bedingungen für diese Versuchsreihe weitgehend übernommen wurden, wird mit Hydrocortison nur eine geringe Erhöhung des TEER und nur eine geringe Verminderung der Permeabilität der untersuchten Parazellulärmarker erreicht. Mit serumfreiem Medium ohne Hydrocortison-Zusatz werden keine dichten Monolayer erhalten. Dagegen haben so kultivierte Zellen bei Hoheisel et al. schon einen höheren TEER und eine geringere Sucrose-Permeabilität als mit Serum kultivierte Zellen. Als mögliche Ursache für die veränderte Rangfolge kommt die Verwendung unterschiedlicher Sera in Betracht (Pferdeserum anstelle von Ochsen Serum).

3.1.4.5 Einfluss von Astrozyten-konditioniertem Medium und cAMP auf den Transport von FITC-Dextran 4000

Als weiterer Ansatz der Kulturoptimierung wurde der Einfluss von ACM und von cAMP untersucht. Rubin et al. [173] beschreiben eine Erhöhung des TEER und eine deutliche Reduktion der Sucrose-Permeabilität durch die Verwendung dieser Kombination. In Verbindung mit dem cAMP-Analogon CPT-cAMP wurde der Phosphodiesterase-Hemmstoff RO-20-1724 (vgl. 3.1.3.3) eingesetzt. Die Durchführung der Experimente erfolgte 48 h nach der cAMP-Behandlung. Zum Vergleich wurden mit normalem Medium (EM) kultivierte Zellen verwendet (Tabelle 3.7, Abbildung 3.16, Abbildung 3.17 und Tabelle 3.8).

Tabelle 3.7: Einfluss von cAMP und ACM auf den Transport von FD-4 (100 µg/ml); Permeabilitätskoeffizienten

FD-4		P_{app} [cm/s]	
EM, cAMP-	EM, cAMP+	ACM, cAMP-	ACM, cAMP+
$8,49 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$	$6,85 \times 10^{-6}$	$9,85 \times 10^{-6}$

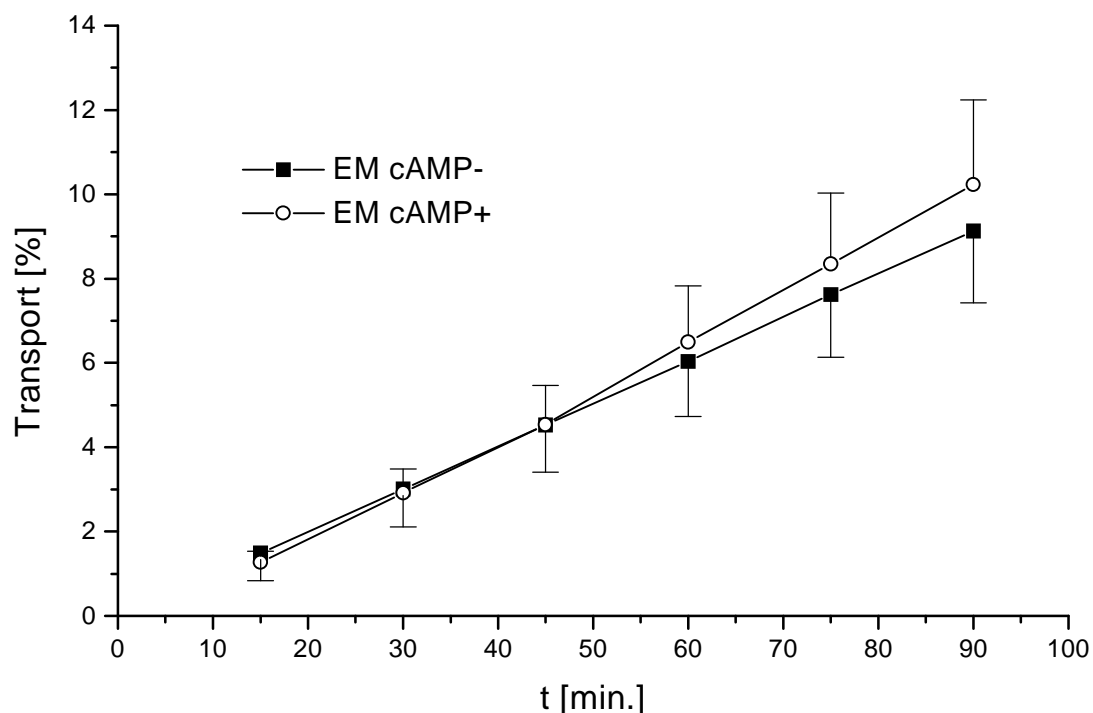


Abbildung 3.16: Einfluss von cAMP auf den Transport von FD-4 (100 µg/ml); EM (Einzelwerte siehe Tabelle 5.30 und Tabelle 5.31)

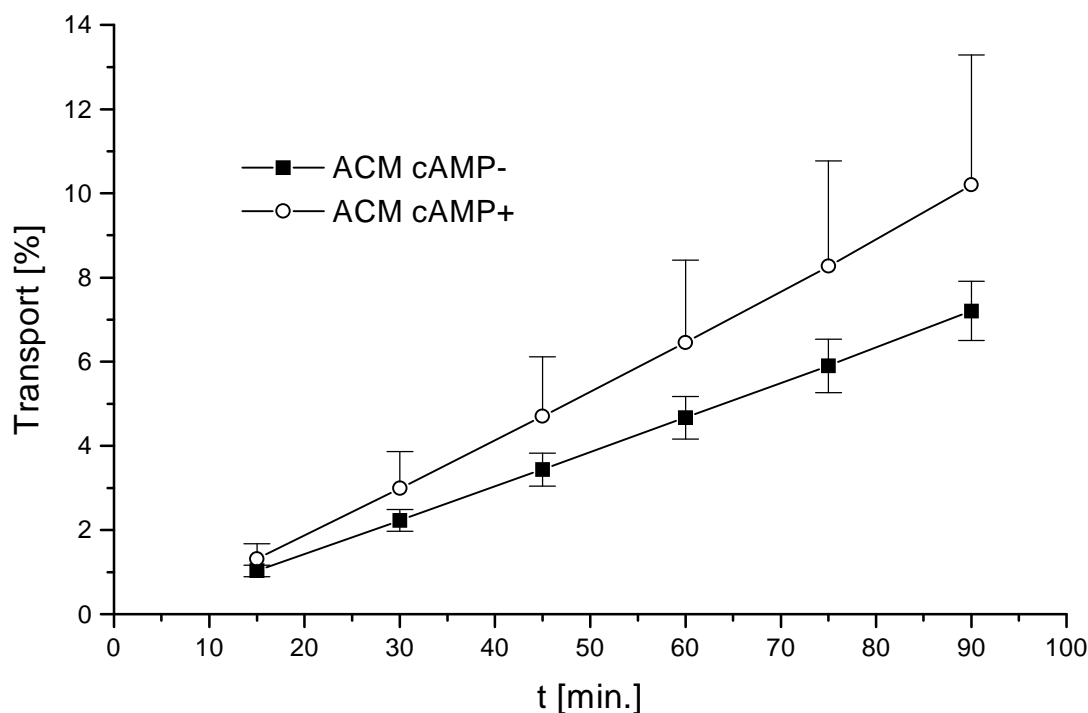


Abbildung 3.17: Einfluss von cAMP auf den Transport von FD-4 (100 µg/ml); ACM (Einzelwerte siehe Tabelle 5.32 und Tabelle 5.33)

Tabelle 3.8 Einfluss von cAMP und ACM auf den TEER

	TEER [$\Omega \times \text{cm}^2$]			
	EM, cAMP-	EM, cAMP+	ACM, cAMP-	ACM, cAMP+
Mittelwert	109	232	290	183
s	13,6	27,0	21,9	25,3
n	6	6	6	6

Mit ACM kultivierte Zellen haben einen deutlich höheren TEER (+165 %) als in EM kultivierte; die Permeabilität von FD-4 reduziert sich jedoch nur um ca. 20 %. Die Erhöhung des cAMP-Levels hat auf den Transport von FD-4 durch mit EM kultivierte Zellmonolayer keinen Effekt. Dagegen erhöht sich der TEER deutlich um ca. 110 %. Die Verwendung von cAMP bei in ACM kultivierten Zellen bewirkt eine Erhöhung der Transportrate und eine Erniedrigung des TEERs auf 63 % des für ACM gemessenen Wertes.

Somit wirkt sich nur die Verwendung von ACM positiv auf die Zelldichte aus, eine cAMP-Behandlung bietet keine klaren Vorteile; dies steht im Gegensatz zu der Arbeit von Rubin et al. [173]. Die Ursachen hierfür sind unklar; zudem löst der *second messenger* in der Zelle viele Prozesse aus, die zu nicht überschaubaren Veränderungen führen können, so dass ein Einsatz insgesamt nicht ratsam erscheint.

Die mit ACM zu erzielende Verbesserung ist in Bezug auf den TEER deutlich, jedoch wird der Transport von FD-4 nur wenig beeinflusst, so dass aufgrund des hohen Aufwands für die Gewinnung des ACM seine routinemäßige Verwendung in Frage gestellt werden muss.

3.1.4.6 Einfluss des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid auf die Integrität der Zellmonolayer

Die BCEC-Monolayer werden u.a. für ein Screening von neuen Arzneistoffen eingesetzt. Dazu ist es notwendig, die Arzneistoffe in dem für die Transport-Experimente verwendeten Puffer zu lösen. Die Konzentrationen sind dabei so zu wählen, dass eine sichere Detektion der Substanz im basolateralen Kompartiment mit gängigen Analysemethoden (wie z.B. HPLC) möglich ist. Oftmals sind die Substanzen in wässrigen Medien schwerlöslich, so dass ein Lösungsvermittler eingesetzt werden muss. Häufig wird hierbei DMSO verwendet; die Endkonzentrationen liegen hier typischerweise im Bereich von 1 %. Um den Einfluss von DMSO auf die Integrität der Zellen zu untersuchen, wurde die Diffusion von FD-4 in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration untersucht (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.9).

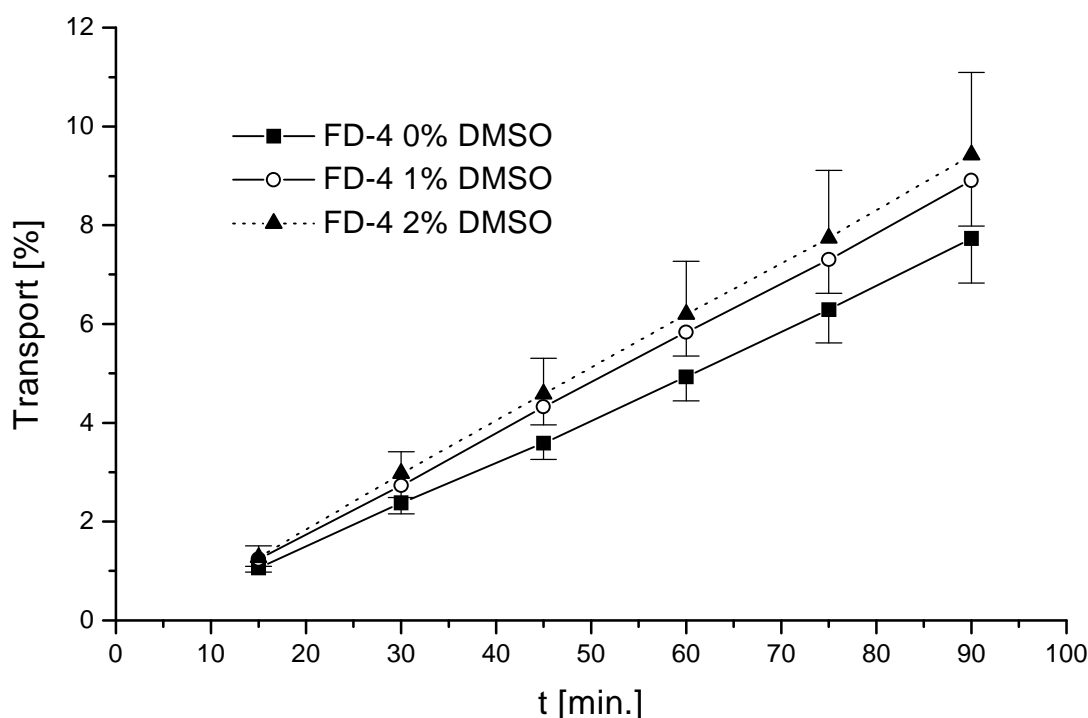


Abbildung 3.18: Einfluss des Lösungsvermittlers DMSO auf den Transport von FD-4 (10 µg/ml; Einzelwerte siehe Tabelle 5.37 bis Tabelle 5.39)

Tabelle 3.9: Permeabilitätskoeffizienten des Transports von FD-4 (10 µg/ml)

FD-4 +	P_{app} [cm/s]
0 % DMSO	$7,37 \times 10^{-6}$
1 % DMSO	$8,50 \times 10^{-6}$
2 % DMSO	$9,00 \times 10^{-6}$

Eine höhere DMSO-Konzentration resultiert in einer höheren Permeabilität; die Unterschiede zwischen den gemessenen Transportraten sind jedoch gering, so dass die Verwendung von DMSO in einer niedrigen Konzentration (bis 2 %) zur Lösungsvermittlung vertretbar erscheint.

3.1.5 Einsatz des Zellkulturmodells für die Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen

3.1.5.1 Einsatz des Zellkulturmodells für das Screening von neuen Arzneistoffen

Im Verlauf der Arbeit wurde die Permeation von Forschungssubstanzen mehrerer pharmazeutischer Unternehmen durch BCEC-Monolayer untersucht. Abbildung 3.19 und Tabelle 3.10 zeigen die Transportraten und Permeabilitätskoeffizienten von acht Substanzen.

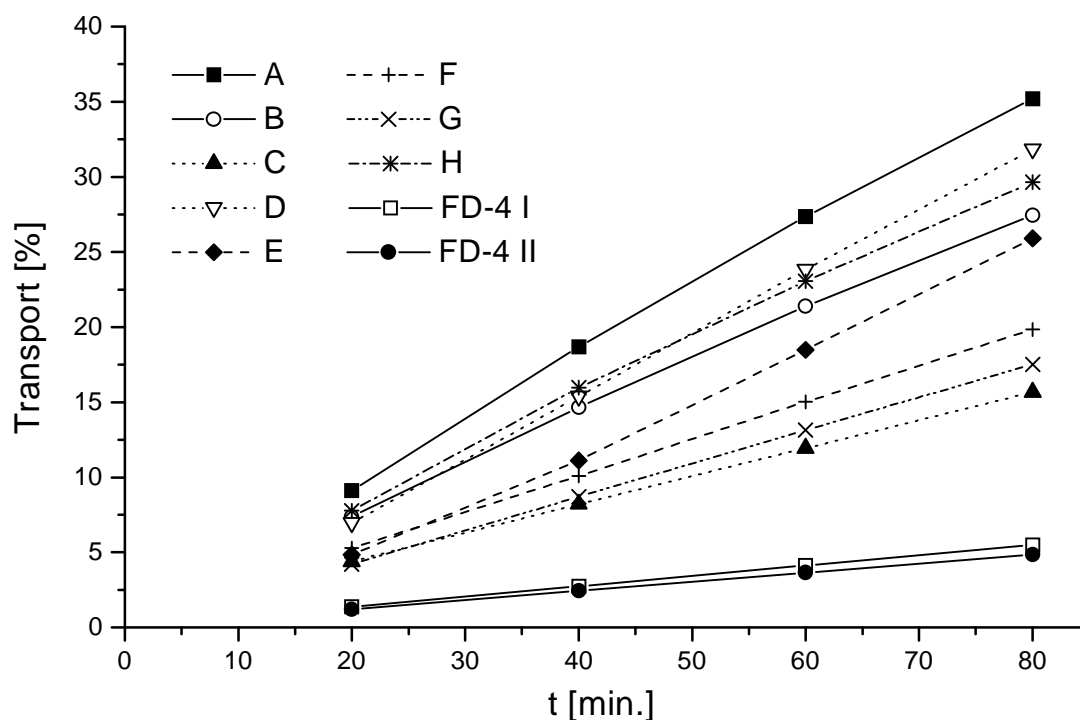


Abbildung 3.19: Transport von 8 Forschungssubstanzen (A –H) und FD-4 (10 µg/ml) durch BCEC-Monolayer (n = 4, die eingesetzten Lösungen enthielten eine DMSO-Konzentration von 0,5 %)

Tabelle 3.10: Transport von Forschungssubstanzen und FD-4 durch BCEC-Monolayer; Permeabilitätskoeffizienten

Substanz	P_{app} [cm/s]	Substanz	P_{app} [cm/s]
A	$3,62 \times 10^{-5}$	F	$2,02 \times 10^{-5}$
B	$2,79 \times 10^{-5}$	G	$1,85 \times 10^{-5}$
C	$1,57 \times 10^{-5}$	H	$3,03 \times 10^{-5}$
D	$3,46 \times 10^{-5}$	FD-4 I	$5,73 \times 10^{-6}$
E	$2,94 \times 10^{-5}$	FD-4 II	$5,06 \times 10^{-6}$

Hierbei stellte sich heraus, dass trotz der recht hohen parazellulären Durchlässigkeit der Zellen auch bei Substanzen ähnlichen Molekulargewichts (hier 400 bis 500 Da) deutliche Unterschiede im Permeationsverhalten zu beobachten sind. Dies ermöglicht die Bildung einer Rangfolge mit dem Ziel, geeignete Substanzen für weitergehende Untersuchungen zu selektieren. Da die durch die Zellen verschiedenener Aussaaten bedingte Variabilität einen direkten Vergleich erschwert, wurden bei diesen Experimenten stets pro verwendeter Zellkulturplatte 3 bis 4 Filtereinsätze für die Untersuchung der Permeation eines Parazellulärmarkers (hier FD-4) verwendet.

3.1.5.2 Untersuchung von p-Glykoprotein-abhängigen Transportprozessen

Eine wichtige Aufgabe der BHS ist es, das unkontrollierte Eindringen potenziell schädlicher endogener und exogener Substanzen in das ZNS zu verhindern. Neben der reinen Barrierefunktion durch die *tight junctions* weisen die Zellen hierfür spezielle Transportsysteme wie das p-Glykoprotein (vgl. 1.1.3.3) auf. Die Existenz von PGP konnte auch in kultivierten BCECs nachgewiesen werden [85]. Um zu untersuchen, ob mit dem verwendeten Kulturmodell der PGP-abhängige Transport von Substanzen erfasst werden kann, wurde die Permeabilität von Rhodamin 123, einem fluoreszierenden PGP-Substrat, durch BCEC-Monolayer bestimmt. Verapamil, das ebenfalls von PGP transportiert wird, wurde zur kompetitiven Inhibition zugesetzt (Tabelle 3.11, Abbildung 3.20).

Tabelle 3.11: Permeabilitätskoeffizienten des Transports von CF (1 µg/ml) und Rhodamin 123 (10 µg/ml)

Substanz	P_{app} [cm/s]
CF	$6,7 \times 10^{-6}$
Rhodamin 123	$9,7 \times 10^{-6}$
Rhodamin 123 + Verapamil (50 µg/ml)	$12,4 \times 10^{-6}$

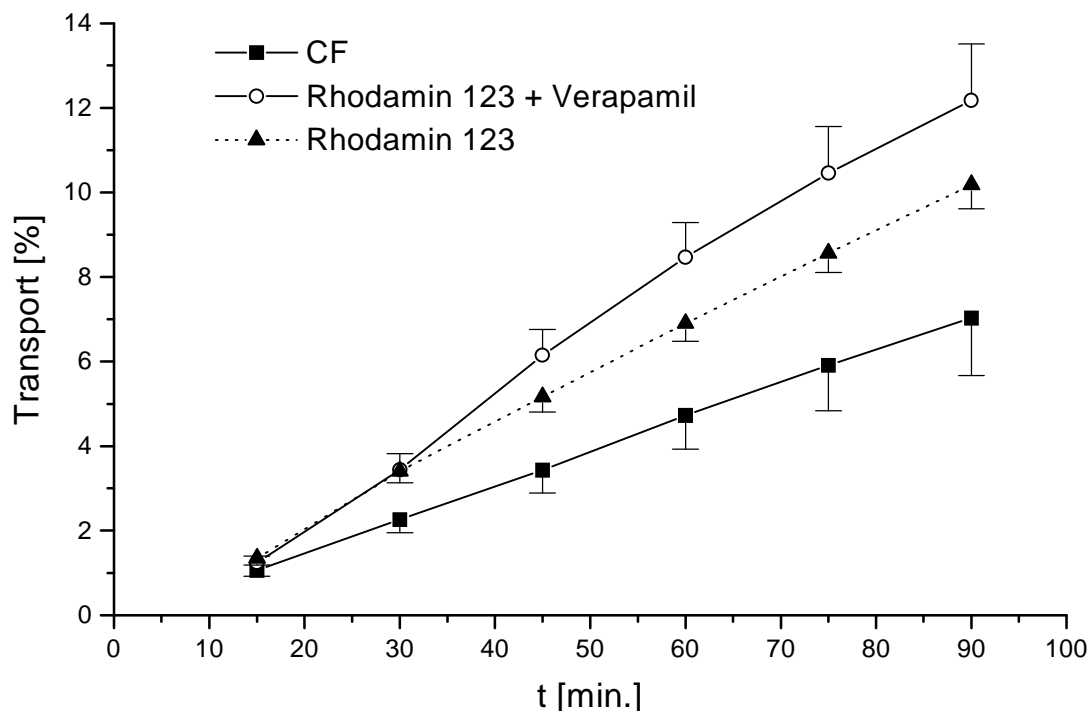


Abbildung 3.20: Einfluss von Verapamil (50 $\mu\text{g/ml}$) auf den Transport von Rhodamin 123 (10 $\mu\text{g/ml}$) durch BCEC-Monolayer; CF (1 $\mu\text{g/ml}$) als Vergleich (Einzelwerte siehe Tabelle 5.34 bis Tabelle 5.36)

Die Transportraten für Rhodamin 123 ohne und mit Verapamil-Zusatz unterscheiden sich ab einem Zeitpunkt von 45 min. Dieser wahrscheinlich auf die Existenz von PGP in den Zellen zurückzuführende Unterschied ist deutlich, aber in Relation zu den absoluten Transportraten recht gering. Dies ist jedoch plausibel, da der insgesamt gemessene Transport nur zu einem kleinen Teil auf einer transzellulären Permeation beruht. Der überwiegende Anteil von Rhodamin 123 diffundiert wie das CF parazellulär. Dennoch kann das Zellkulturmodell aus BCECs prinzipiell zur funktionellen Untersuchung PGP-abhängiger Transportprozesse eingesetzt werden.

3.1.5.3 Untersuchung des Transports von Salicylsäure und Salicylsäure-Glucosid

Ein Ansatz für einen verbesserten Arzneistofftransport in das Gehirn ist das Ausnutzen von existierenden Carrierproteinen (vgl. 1.3.3). Hierfür erscheint das Glucose-Transportprotein am geeignetsten, da es die größte Kapazität aufweist. Um zu untersuchen, ob die Glykosylierung eines Arzneistoffs eine erhöhte Permeabilität durch den Zellmonolayer aufweist, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wießler (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) Transport-Experimente mit Salicylsäure und Salicylsäure-Glucosid in der Costar-Apparatur durchgeführt (Abbildung 3.21, Tabelle 3.12).

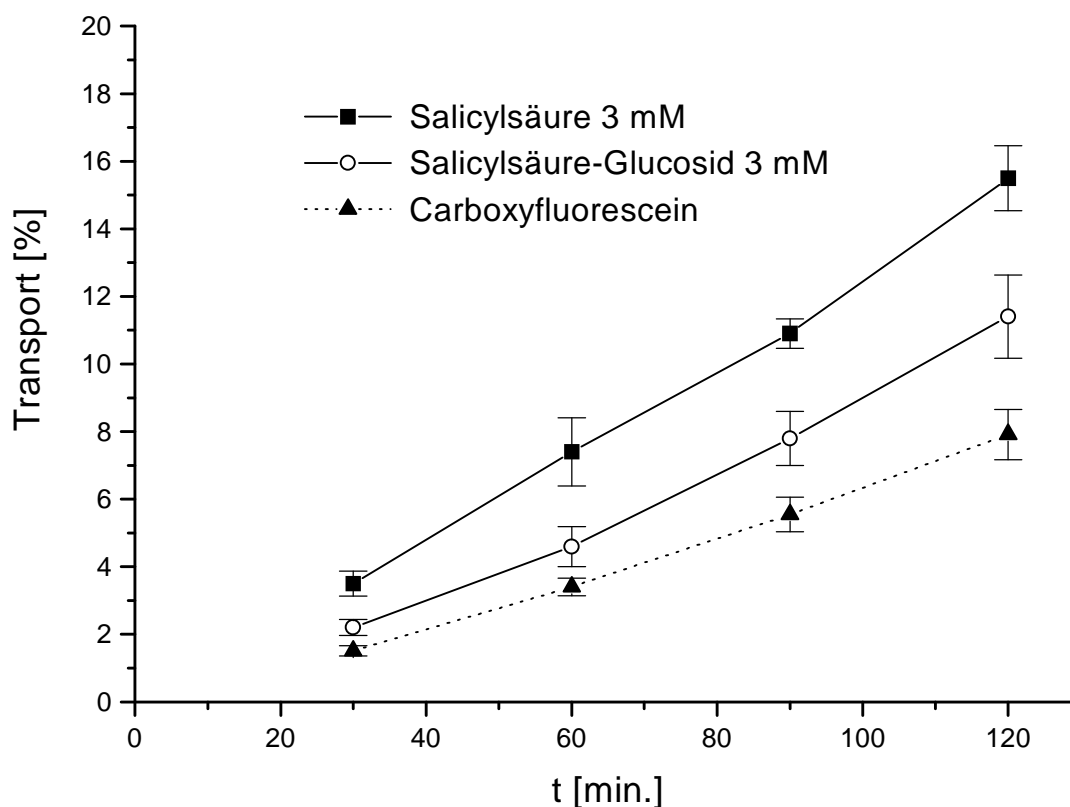


Abbildung 3.21: Transport von Salicylsäure, Salicylsäure-Glucosid und CF durch BCEC-Monolayer in der Costar-Apparatur (Einzelwerte siehe Tabelle 5.40 bis Tabelle 5.42)

Tabelle 3.12: Permeabilitätskoeffizienten

Substanz	P_{app} [cm/s]
CF	$1,05 \times 10^{-5}$
Salicylsäure	$1,94 \times 10^{-5}$
Salicylsäure-Glucosid	$1,51 \times 10^{-5}$

Die Permeabilität der Salicylsäure liegt deutlich über der des Parazellulärmarkers CF. Somit ist wahrscheinlich, dass Salicylsäure auch transzellulär permeiert; es gibt Hinweise darauf, dass sie durch das an der Blut-Hirn Schranke exprimierte Monocarbonsäure-Carrierprotein transportiert wird [91, 192]. Eine Glykosylierung bewirkt dagegen keine weitere Erhöhung der Permeationsrate, was einen Transport des Glucose-Konjugates durch das Glucose-Transportprotein unwahrscheinlich macht. Diese Beobachtung stimmt mit den Untersuchungen von Halmos et al. [72] überein, die für eine Reihe von Glucose-konjugierten Chlorambucil-Derivaten keinen Transport durch das an der Blut-Hirn Schranke dominante Glucose-Carrierprotein GLUT1 feststellen konnten.

3.2 Kationisiertes Albumin als Vektor

3.2.1 Eigenschaften von kationisiertem Albumin

Die Kationisierung von Rinder-Serumalbumin führte zu einem Anstieg des isoelektrischen Punktes (pH_{IEP}) von 4,5 auf über 8,2 (Abbildung 3.22 links). Der pH_{IEP} von CBSA unterscheidet sich nur unwesentlich von dem des fluoreszenzmarkierten Derivats. Obwohl durch die Fluoreszenzmarkierung bei dieser Charge im Mittel 2,4 primäre Amine pro CBSA-Molekül in ein Amid übergehen, bleibt insgesamt die positive Ladung des Proteins erhalten. Dieses Ergebnis ist auch für die Sulfhydrierung von CBSA relevant (vgl. 3.3.1), da durch diese Reaktion ebenfalls Aminogruppen modifiziert werden. BSA, CBSA und FITC-CBSA zeigen die gleiche elektrophoretische Mobilität (Abbildung 3.22 rechts); somit bewirkt die Kationisierung mit Ethylendiamin unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Bildung von Di- oder Oligomeren des Proteins.

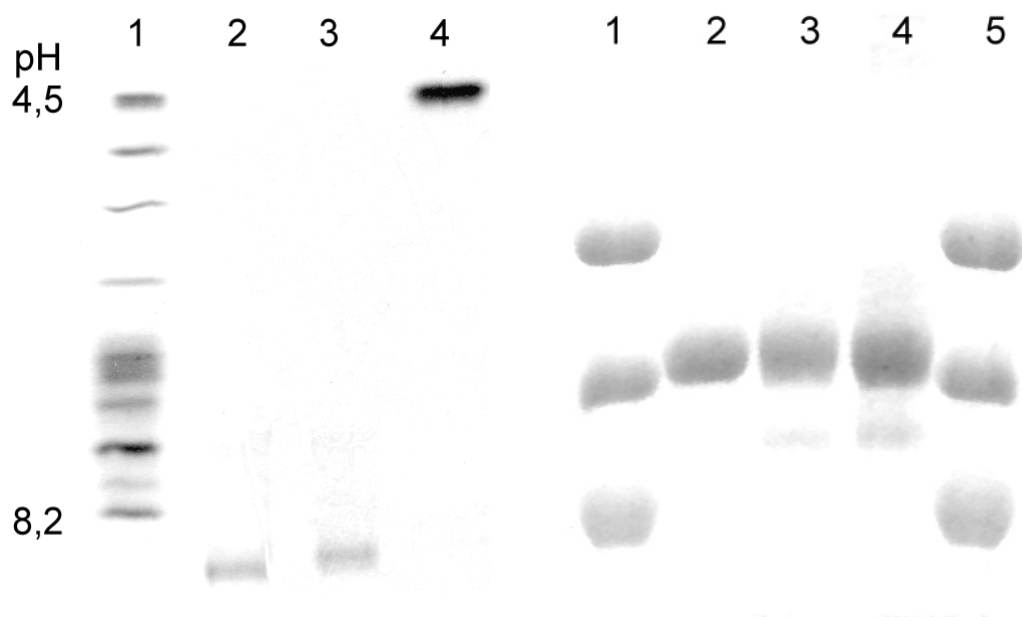


Abbildung 3.22 links: Isoelektrische Fokussierung von BSA (Bahn 4), CBSA (Bahn 2) und FITC-CBSA (Bahn 3); Bahn 1: Standards mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von 4,5 bis 8,2; **rechts:** SDS-Gelelektrophorese von BSA (Bahn 2), CBSA (Bahn 3) und FITC-CBSA (Bahn 4); Bahn 1 u. 5: Standards mit Molekulargewichten von 94.000, 67.000 und 43.000 (von oben nach unten)

3.2.2 Untersuchung der Aufnahme von CBSA in BCECs

Die Eignung von CBSA als Vektor für ein liposomales Konjugat wurde überprüft, indem die Aufnahme des Proteins in die als BHS-Modell verwendeten Endothelzell-Monolayer untersucht wurde. Dabei kam das fluoreszenzmarkierte Derivat FITC-CBSA zum Einsatz. Die Interaktion mit den Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch und durch Aufnahme-Experimente in Mikrotiterplatten untersucht.

3.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von FITC-CBSA in BCECs

Die Inkubation von auf Glasobjektträgern kultivierten BCECs mit FITC-CBSA führte zu einer deutlichen, zellgebundenen Fluoreszenz (Abbildung 3.23). In der Phasenkontrastaufnahme sind zwei BCECs mit ihrer in Kultur typischen spindelförmigen Morphologie zu erkennen. Ebenso sind die Zellkerne deutlich zu sehen. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt eine punktuelle Verteilung von FITC-CBSA im Präparat. Größe und Lokalisation der fluoreszierenden Punkte deuten auf intrazelluläre Vesikel hin, in die das FITC-CBSA aufgenommen wurde. Auf eine Lokalisation der Fluoreszenz in der Zelle deutet ebenfalls hin, dass die Bereiche der Zellkerne bei beiden Zellen etwas dunkler erscheinen als der restliche Zellkörper.

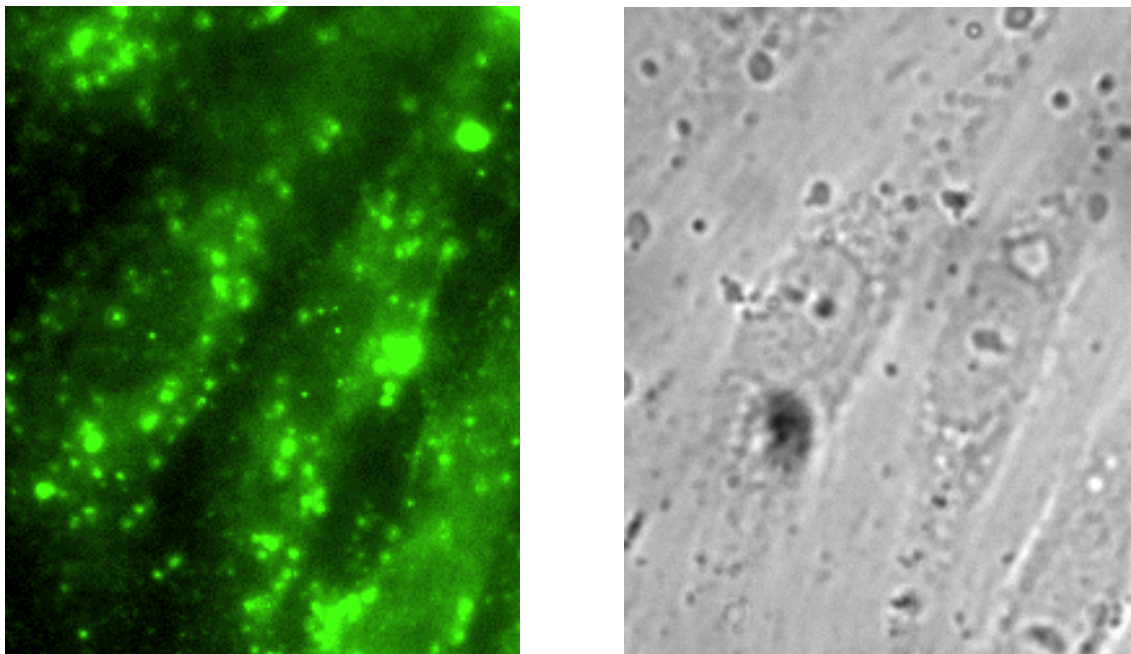


Abbildung 3.23: Inkubation von BCECs mit FITC-CBSA (100 µg/ml); Inkubationszeit 30 min.; **links:** Fluoreszenz; **rechts:** Phasenkontrast; Abbildungsgröße jeweils 55 µm x 70 µm

3.2.2.2 Aufnahme-Experimente mit FITC-BSA und FITC-CBSA in Mikrotiterplatten

Die Bindung bzw. Aufnahme von FITC-CBSA an bzw. in BCECs ist konzentrationsabhängig und sättigbar (Abbildung 3.24). Die bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C bestimmten Werte zeigen eine hohe Bindung von CBSA an die Endothelzellen. Die deutlich höheren zellgebundenen Proteinmengen bei 37 °C deuten darauf hin, dass es bei dieser Temperatur über die Bindung hinaus zu einer Aufnahme von CBSA kommt. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Werte für BSA bei 4 °C und 37 °C nicht, somit ist eine Aufnahme von BSA unwahrscheinlich; allerdings scheint sich auch BSA konzentrationsabhängig und sättigbar an die Zelloberflächen zu adsorbieren.

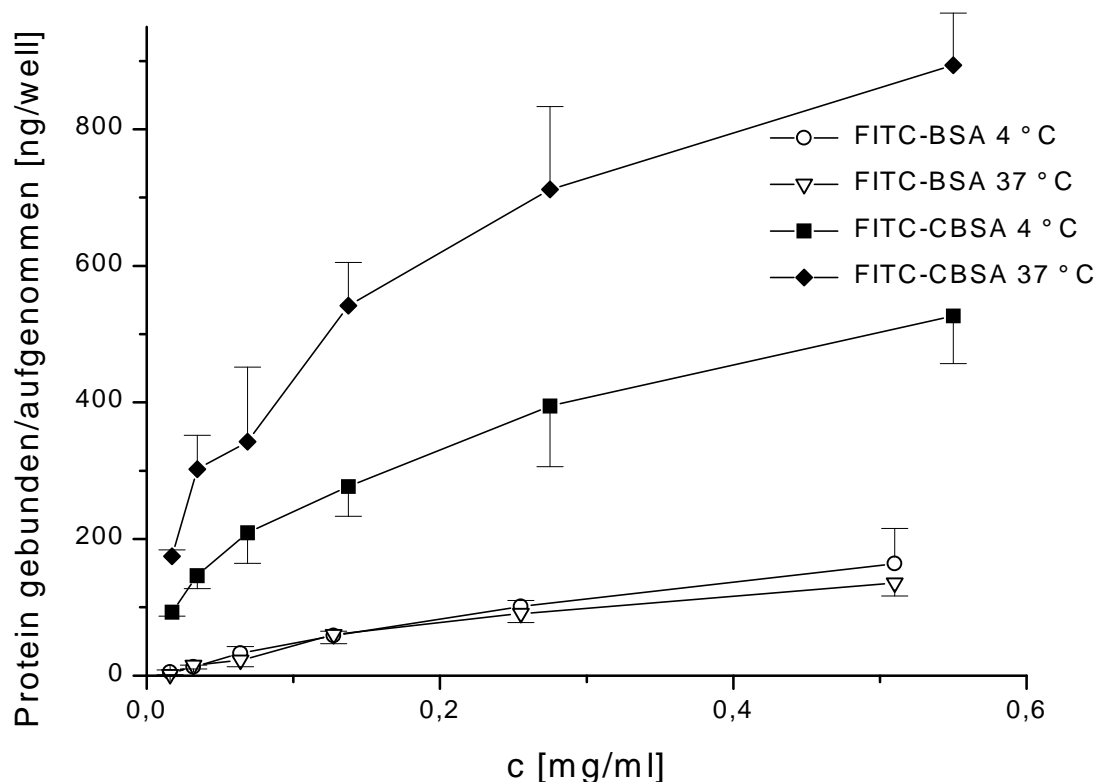


Abbildung 3.24: Bindung / Aufnahme von FITC-BSA und FITC-CBSA an / in BCEC-Monolayer bei 4 °C und 37 °C (Einzelwerte siehe Tabelle 5.43 bis Tabelle 5.46)

Die Untersuchung der Adsorption von FITC-BSA und FITC-CBSA an beschichteten Mikrotiterplatten zeigt ebenfalls eine höhere Bindung des kationisierten Proteins (Abbildung 3.25). Insgesamt sind die adsorbierten Proteinmengen in Relation zu den Experimenten mit BCEC-Monolayern jedoch sehr gering, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse dieser Versuche durch eine Adsorption an die Platten ausgeschlossen werden kann.

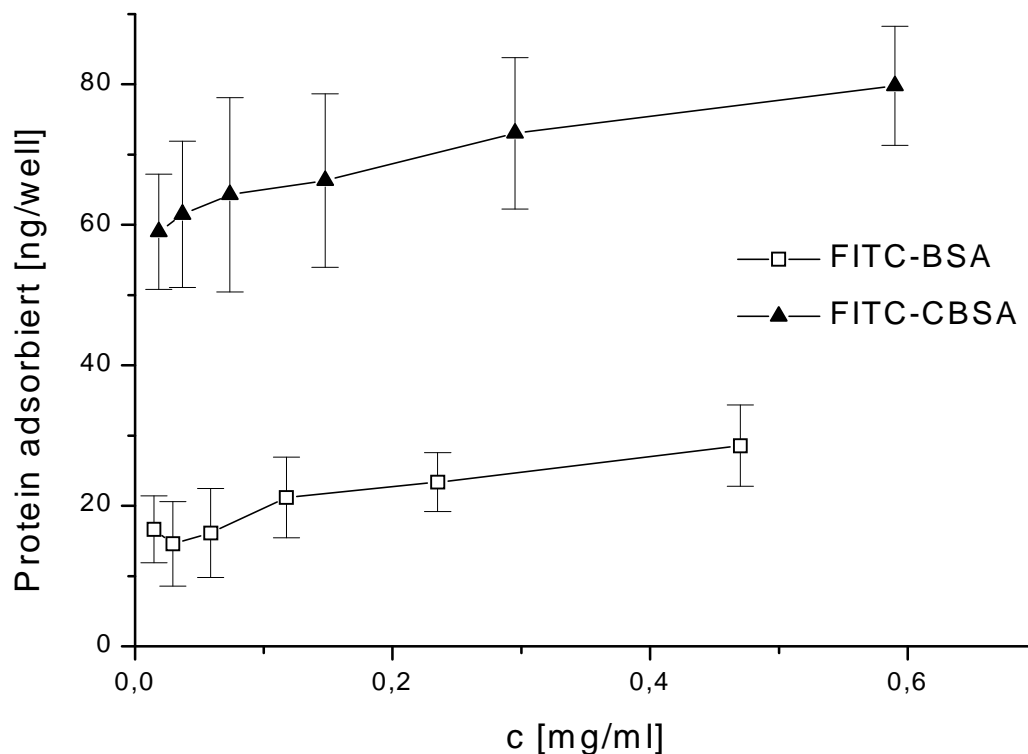


Abbildung 3.25: Adsorption von FITC-BSA und FITC-CBSA an Mikrotiterplatten (Einzelwerte siehe Tabelle 5.47 und Tabelle 5.48)

3.2.2.3 Beeinflussung der Messung mit dem Fluoroskan II durch die Plattengeometrie

Bei den in den transparenten Mikrotiterplatten aus Polystyrol direkt durchgeführten Fluoreszenzmessungen mit dem Fluoreszenzleser Fluoroskan II fiel auf, dass im Gegensatz zur Verwendung von speziell für dieses Gerät bestimmten Platten aus schwarzem Kunststoff die Messergebnisse von der Plattengeometrie abhängig sind. Um diesen Einfluss zu quantifizieren, wurde eine komplette Platte mit einer FITC-BSA-Lösung gefüllt und vermessen (Abbildung 3.26). Die am Rand gemessenen Fluoreszenzen liegen durchweg stark über dem Mittelwert (bis über 15 %). Dagegen bilden die inneren Vertiefungen ein recht homogenes Plateau, das bis zu 10 % unter dem Mittelwert liegt. Die folgende Messung erfolgte, ohne die äußeren Vertiefungen zu befüllen (Abbildung 3.27). Die Ergebnisse dieser Messung sind homogener und die Werte zeigen keine Tendenzen, die auf eine systematische Abweichung hindeuten. Eine etwaige Abhängigkeit von der Plattengeometrie kann mit dieser Messanordnung vernachlässigt werden. Bei der Beurteilung der prozentualen Abweichung vom Mittelwert, die in diesem Versuch bei - 10 % bis + 10 % liegt, ist zu beachten, dass sich durch die Messung ohne Berücksichtigung der Randwells ein niedrigerer Mittelwert ergibt, und vergleichbare absolute Abweichungen somit eine höhere relative Abweichung ergeben. Für alle folgenden Messungen in transparenten Mikrotiterplatten wurden die Randwells freigelassen, so dass pro Platte nur noch 60 statt 96 individuelle Experimente möglich waren.

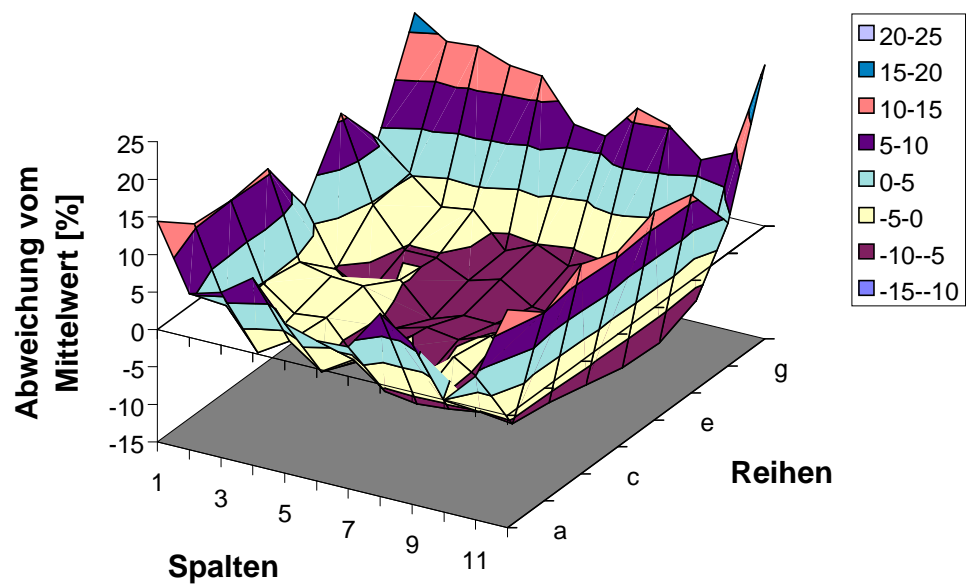


Abbildung 3.26: Fluoreszenz einer FITC-BSA-Lösung ($47 \mu\text{g/ml}$); $200 \mu\text{l/well}$ in allen Vertiefungen; dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Mittelwert der 96 Einzelmessungen

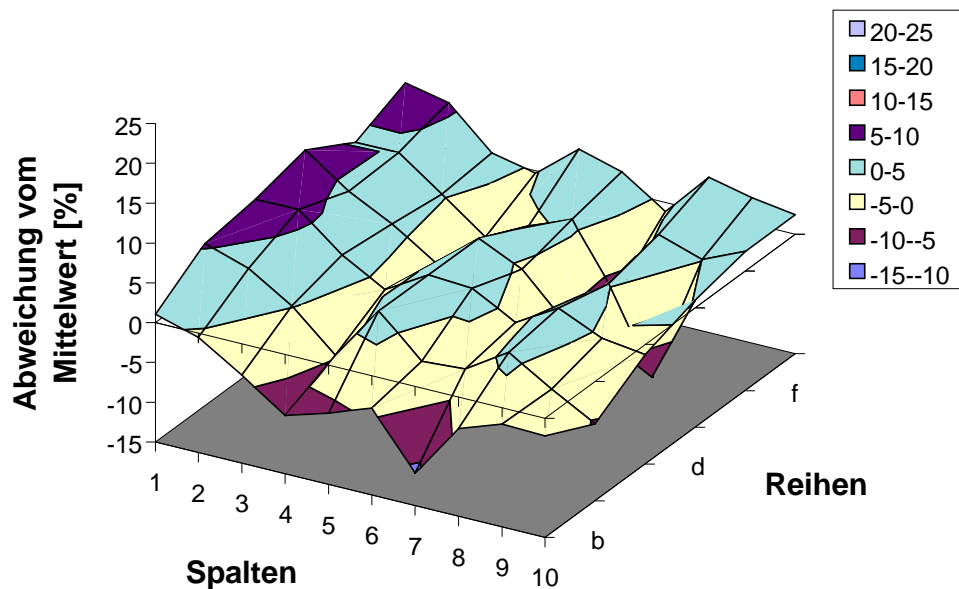


Abbildung 3.27: Fluoreszenz einer FITC-CBSA-Lösung ($47 \mu\text{g/ml}$); $200 \mu\text{l/well}$; Randvertiefungen leer; dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Mittelwert der 60 Einzelmessungen

3.3 Herstellung und Charakterisierung von liposomalen Konjugaten

3.3.1 Sulfhydrierung von Albumin und kationisiertem Albumin

Zur Quantifizierung der Ausbeute der Sulfhydrierung von BSA und CBSA wurde die Methode von Ellman (vgl. 2.4.5) eingesetzt. Die mit Cystein-Lösungen aufgestellte Eichgerade (Abbildung 3.28) zeigt die gute Linearität der Methode.

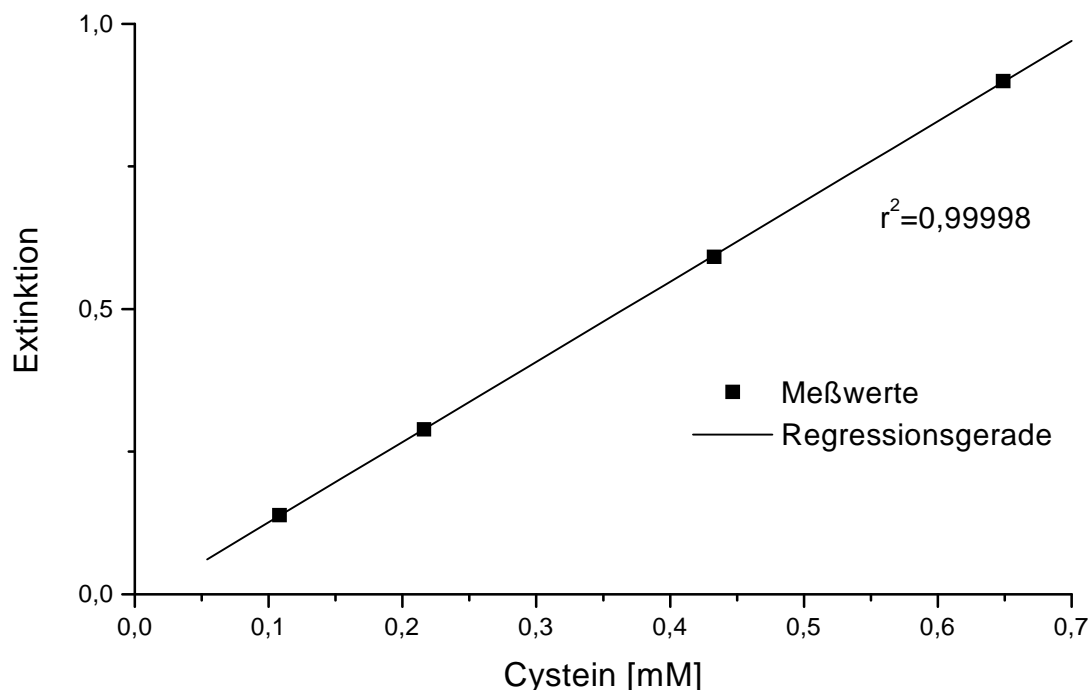


Abbildung 3.28: Eichgerade der Bestimmung nach Ellman

Die Thiolierung von BSA und CBSA mit SATA erfolgt in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis SATA zu Protein (Abbildung 3.29). Für die untersuchten Konzentrationsverhältnisse ergibt sich bei beiden Proteinen ein nahezu linearer Anstieg der Zahl der eingeführten Thiolgruppen. Dabei unterscheiden sich die Werte für BSA und CBSA nur gering. Die durch die Kationisierung höhere Zahl von Aminogruppen des CBSA bewirkt somit keine effektivere Sulfhydrierung. Die Ausbeuten liegen im Bereich von 35 % bis 65 %. Ähnliche Ausbeuten finden sich in der Literatur für IgG [49]; für Peroxidase, Thyroglobulin [49], Amylase und Plasminogen [77] liegen die Werte deutlich niedriger (max. 20 %). Tabelle 3.13 zeigt eine Übersicht über alle sulfhydrierten Proteinchargen.

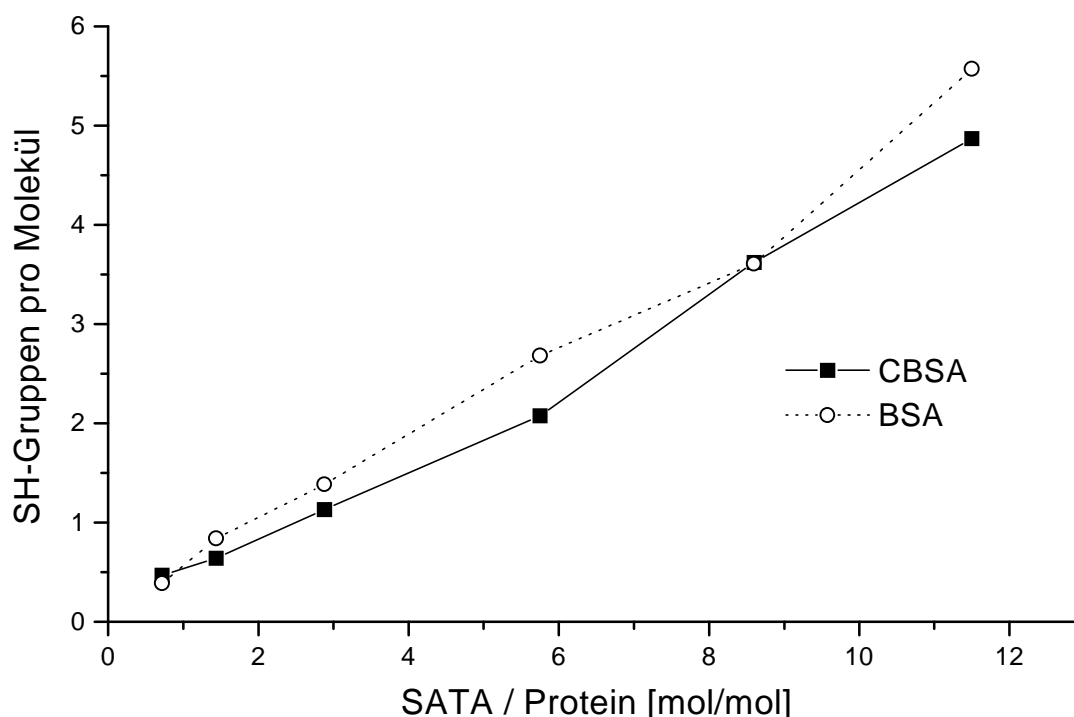


Abbildung 3.29: Sulfhydrierung von BSA und CBSA: Ausbeute der Reaktion

Tabelle 3.13: Sulfhydrierte Proteinchargen

Protein: Albumin und kationisiertes Albumin wurden sulfhydriert; SATA/Protein: Ausgangsverhältnis Thiolierungsreagenz zu Protein [mol/mol]; SH/Protein: Anzahl der eingefügten SH-Gruppen pro Protein [mol/mol]; Effizienz: Quotient aus SH/Protein und SATA/Protein, Angabe in %

Nr.	Protein	SATA/Protein	SH/Protein	Effizienz
1	CBSA	0,7	0,5	65,1 %
2	CBSA	1,4	0,6	44,5 %
3	CBSA	2,9	1,1	39,2 %
4	CBSA	5,8	2,1	36,1 %
5	CBSA	8,6	3,6	42,1 %
6	CBSA	11,5	4,9	42,4 %
7	BSA	0,7	0,4	53,9 %
8	BSA	1,4	0,8	58,4 %
9	BSA	2,9	1,4	48,1 %
10	BSA	5,8	2,7	46,7 %
11	BSA	8,6	3,6	42,0 %

Nr.	Protein	SATA/Protein	SH/Protein	Effizienz
12	BSA	11,5	5,6	48,5 %
13	CBSA	2,9	1,7	58,0 %
14	CBSA	5,8	3,0	51,8 %
15	BSA	2,9	1,8	62,7 %
16	BSA	5,8	3,4	58,2 %
17	CBSA	2,9	1,4	49,2 %
18	CBSA	5,8	3,0	50,4 %
19	BSA	2,9	1,8	61,9 %
20	BSA	5,8	3,8	64,6 %
21	CBSA	2,9	1,2	40,5 %
22	BSA	2,9	1,5	49,6 %

Die Reproduzierbarkeit der Sulfhydrierungsreaktion ist als gut zu beurteilen. Abbildung 3.30 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von unterschiedlichen Reaktionsansätzen bei zwei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen SATA zu Protein für beide Proteine. Die relativen Standardabweichungen liegen für alle Gruppen im Bereich von 15 % bis 20 %.

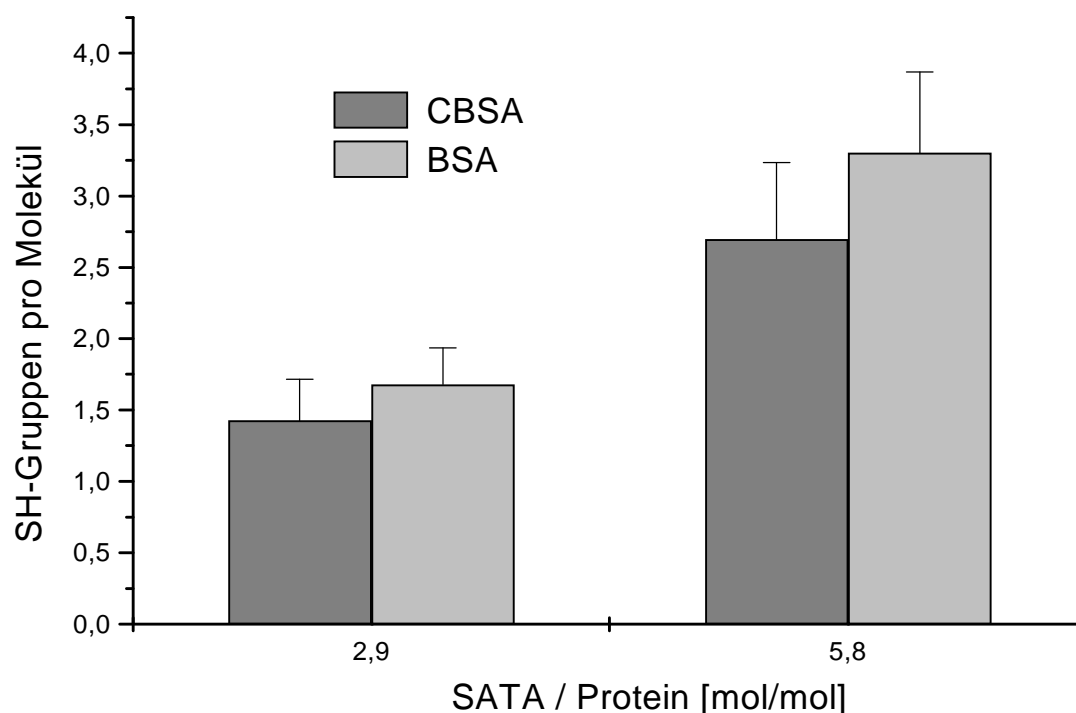


Abbildung 3.30: Reproduzierbarkeit der Sulfhydrierung mit SATA; Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 (SATA/Protein = 5,8) bzw. 4 (SATA/Protein = 2,9) Sulfhydrierungsreaktionen

3.3.2 Eigenschaften von Liposomen

Eine wichtige Vorgabe war die Herstellung möglichst stabiler Vesikel. Deshalb wurden zumeist die Lipide DSPC und CH verwendet, da ihre Verwendung in einer geeigneten Mischung zu sehr stabilen Liposomen führen. Zusätzlich wurde im Hinblick auf *in vivo*-Untersuchungen DSPE-MPEG in die Liposomenmembran integriert, um eine schnelle Aufnahme durch die Makrophagen des RES zu vermeiden. Als Kopplungskomponente wurde DSPE-MPEG-MI verwendet, da es mit Thiolen unter Bildung eines stabilen Thioethers reagiert, und es zu den wenigen kommerziell erhältlichen Linkern mit einer PEG-Komponente gehört.

Eine weitere Vorgabe war es, möglichst kleine Vesikel zu generieren. Dies geschah zumeist durch Extrusion; die dabei verwendeten Membranen hatten eine Porenweite von 50 bis 200 nm. Allerdings war es für einige Versuchsreihen nötig, größere einheitliche Liposomenchargen zu generieren, als dies mit dem LiposofastTM-Gerät möglich war, so dass hier die Ultraschallmethode zum Einsatz kam.

3.3.2.1 Vesikelgröße

Die Vesikelgröße ist abhängig von der Herstellungsmethode und der Lipidzusammensetzung. Durch die Kopplung von Protein kam es bei allen Chargen zu einer geringfügigen Vesikelvergrößerung. Die maximale Vergrößerung lag bei ca. 10 nm, so dass eine Agglomeratbildung durch die Kopplung ausgeschlossen werden konnte. Tabelle 3.14 gibt eine Übersicht über die Herstellungsparameter und die Vesikelgröße aller Liposomenchargen.

Die Vesikelgröße ist bei beiden Herstellungsmethoden umso geringer, je niedriger die Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipidmischung ist. Liposomen, die Rh-PE als Fluoreszenzmarker enthielten, sind durchweg 10 bis 15 nm größer als vergleichbare Präparationen ohne das fluoreszenzmarkierte Lipid. Mit der Ultraschallmethode generierte Liposomen sind bei den gewählten Beschallungsparametern deutlich größer als bei der Extrusion durch 50 nm Membranen (Abbildung 3.31; mittlere Vesikelgröße 151 nm bzw. 90 nm). Eine verlängerte Beschallungszeit (60 statt 20 min.) und eine höhere Beschallungsintensität (Stufe 10 statt 8) bewirkten nur eine marginale Verkleinerung, so dass die zuvor gewählten Parameter (vgl. 2.5.1.1) beibehalten wurden.

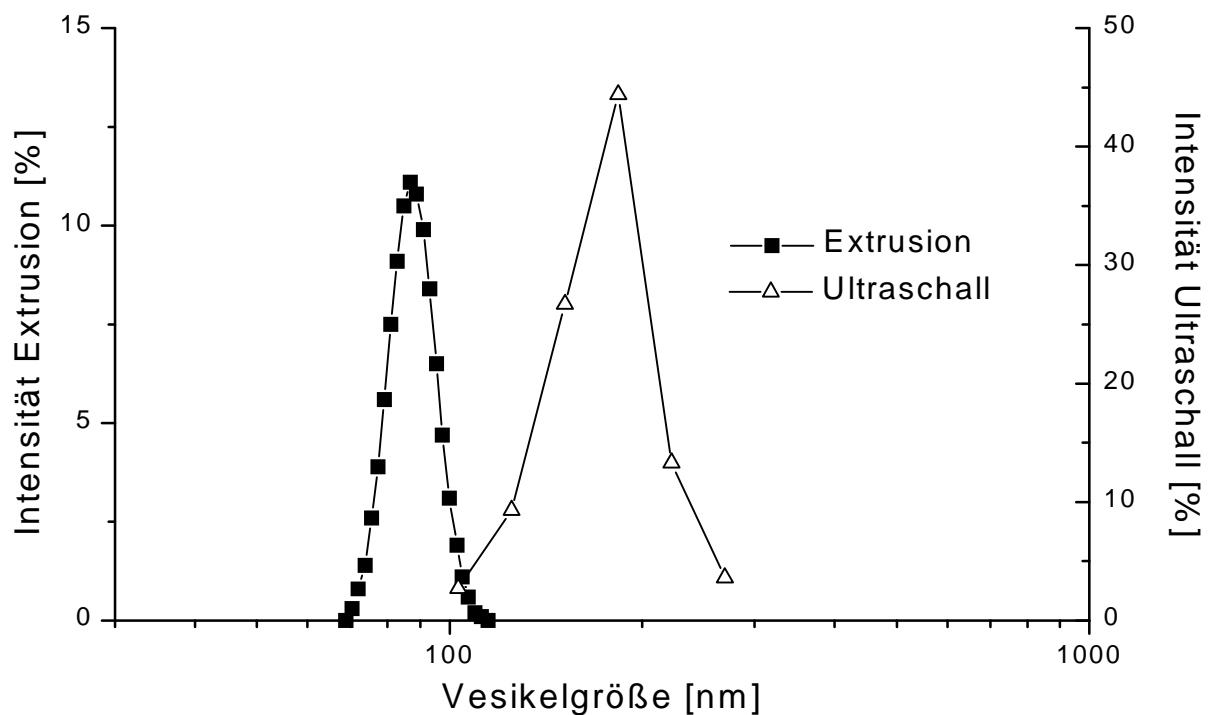


Abbildung 3.31: Größenverteilung von extrudierten (Charge 24) und Ultraschall-behandelten Liposomen (Charge 46)

3.3.2.2 Einschluss von 5(6)-Carboxyfluoreszein

Der Einschluss von CF ist abhängig von der Liposomengröße, der Lipidkomposition und der Herstellungsmethode. Das eingeschlossene CF-Volumen aller CF-haltigen Liposomenchargen findet sich in Tabelle 3.14. Bei mit Ultraschall generierten Liposomen ist der CF-Einschluss deutlich höher als bei extrudierten Vesikeln vergleichbarer Grösse. Die Präsenz von Rh-PE in den Liposomen wirkt sich negativ auf das Einschlussvolumen aus; dieser Effekt ist bei den mit Ultraschall hergestellten Vesikeln besonders deutlich.

Tabelle 3.14: Liposomen: Göße und CF-Einschluss

Lipide: nur die Hauptlipidkomponente ist angegeben, generell wurde folgendes molares Verhältnis eingesetzt: XXPC 52 : CH 45 : DSPE-MPEG 3; c_L : Gesamtlipidkonzentration bei der Herstellung; Methode: E XX = Extrusion durch Membranfilter der Porenweite XX nm, U = Ultraschall; Temp.: Herstellungstemperatur in °C, RT = Raumtemperatur; Rh-PE: eingesetzte Menge, Angabe in mol % bezogen auf Gesamtlipid; CF: eingesetzte Konzentration in der Hydratationslösung; pH: pH-Wert der eingesetzten CF-Lösung; Größe = mittlere Vesikelgröße in nm; PD = Polydispersität; CF [l/mol]: eingeschlossenes Volumen der CF-Lösung, Angabe in l pro mol Gesamtlipid, n.a. = nicht analysiert

Charge	Lipide	c_L [mM]	Methode	Temp.	Rh-PE	CF	pH	Größe [nm]	PD	CF [l/mol]
1	DSPC	10	E 50	60	/	100 mM	7,4	91,4	0,091	n.a.
2	DSPC	10	E 50	60	/	100 mM	7,4	94,8	0,049	n.a.
3	DSPC	10	E 100	60	/	100 mM	7,4	165,6	0,139	n.a.
4	DSPC	10	E 100	60	/	100 mM	7,4	164,9	0,12	n.a.
5	DSPC	10	E 50	60	3,75 %	/	7,4	95,5	0,096	/
6	DSPC	10	E 50	60	3,75 %	/	7,4	95,2	0,052	/
7	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	74,2	0,066	0,42
8	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	77,7	0,048	0,41
9	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	78,5	0,100	0,44
10	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	76	0,090	0,40
11	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	81,9	0,048	0,39
12	SPC	10	E 50	RT	/	100 mM	7,4	79,2	0,044	0,39
13	SPC	20	E 50	RT	3,75 %	/	7,4	89,7	0,153	/
14	SPC	20	E 50	RT	3,75 %	/	7,4	91,4	0,117	/
15	SPC	20	E 50	RT	3,75 %	/	7,4	93,7	0,098	/
16	SPC	20	E 50	RT	3,75 %	/	7,4	100,2	0,106	/
17	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	110,4	0,019	1,15
18	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	109,2	0,043	1,13
19	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	110,1	0,065	1,11
20	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	114,9	0,087	1,12
21	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	110,3	0,084	1,06
22	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	109	0,069	1,08
23	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	85,8	0,057	0,75
24	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	89,7	0,070	0,75
25	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	93,6	0,068	0,72
26	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	88,9	0,111	0,78

Charge	Lipide	c _L [mM]	Methode	Temp.	Rh-PE	CF	pH	Größe [nm]	PD	CF [l/mol]
27	DSPC	10	E 50	60	1,88 %	/	4,5	98,9	0,074	/
28	DSPC	10	E 50	60	1,88 %	/	4,5	98,7	0,079	/
29	DSPC	10	E 50	60	1,88 %	/	4,5	102,1	0,043	/
30	DSPC	10	E 50	60	1,88 %	/	4,5	98,4	0,093	/
31	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	101,3	0,024	0,54
32	DSPC	10	E 50	60	3,76 %	20 mM	4,5	110,9	0,063	0,52
33	DSPC	10	E 100	60	3,76 %	20 mM	4,5	150,6	0,151	1,11
34	DSPC	10	E 200	60	3,76 %	20 mM	4,5	193,9	0,146	2,05
35	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	103,8	0,251	0,52
36	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	104,7	0,038	0,53
37	DSPC	10	E 50	60	/	20 mM	4,5	104,7	0,183	0,54
38	DSPC	10	E 50	60	3,76 %	20 mM	4,5	122,7	0,175	0,46
39	DSPC	10	E 50	60	3,76 %	20 mM	4,5	118,4	0,028	0,46
40	DSPC	10	E 50	60	3,76 %	20 mM	4,5	122,3	0,092	0,46
41	DSPC	10	E 100	60	3,76 %	20 mM	4,5	164	0,091	1,11
42	DSPC	10	E 200	60	3,76 %	20 mM	4,5	203,6	0,115	1,96
43	DSPC	20	U	60	3,76 %	20 mM	4,5	156,2	0,158	1,99
44	DSPC	20	U	60	3,76 %	20 mM	4,5	157,6	0,150	2,08
45	DSPC	20	U	60	/	20 mM	4,5	150,9	0,184	4,7
46	DSPC	20	U	60	/	20 mM	4,5	151,2	0,178	4,48
47	DMPC	20	U	40	/	20 mM	4,5	126,8	0,193	1,77
48	DMPC	20	U	40	/	20 mM	4,5	131,1	0,187	1,79
49	DSPC	20	U	60	/	20 mM	4,5	151,9	0,167	4,72
50	DSPC ⁵	20	U	60	/	20 mM	4,5	118,1	0,208	1,43

3.3.2.3 Stabilität von DSPE-PEG-MI

Das aufgrund der zu erwartenden Vesikelstabilität ausgewählte Lipid DSPC bedingt durch seine hohe Phasenübergangstemperatur eine Temperatur von ca. 60 °C während der Hydratation des Lipidfilms (vgl. 2.5.1). Mit der zunächst zur Hydratation verwendeten 100 mM CF-Lösung (pH 7,4) ergab sich jedoch keine messbare Kopplung des Proteins.

Als Ursache hierfür kam u.a. eine Instabilität des Linkermoleküls DSPE-PEG-MI und insbesondere der für die Kopplungsreaktion essenziellen Maleimidfunktion unter den Herstellungsbedingungen in Betracht. Die Kopplung mit Liposomen, die SPC als Hauptlipidkomponente enthielten, gelingt zwar problemlos (vgl. Tabelle 3.15), jedoch sind diese Liposomen in Bezug auf den CF-Einschluss instabil (CF-Freigabe in PBS bei 4 °C bis zu 50 % in 14 Tagen). Die Stabilität des Linkers wurde durch Analyse der Kopplungsfähigkeit nach Behandlung bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten untersucht. Abbildung 3.32 zeigt den Anteil an DSPE-PEG-MI, der nach dieser Behandlung an Cystein gekoppelt werden kann.

⁵ Diese Charge enthielt kein DSPE-MPEG

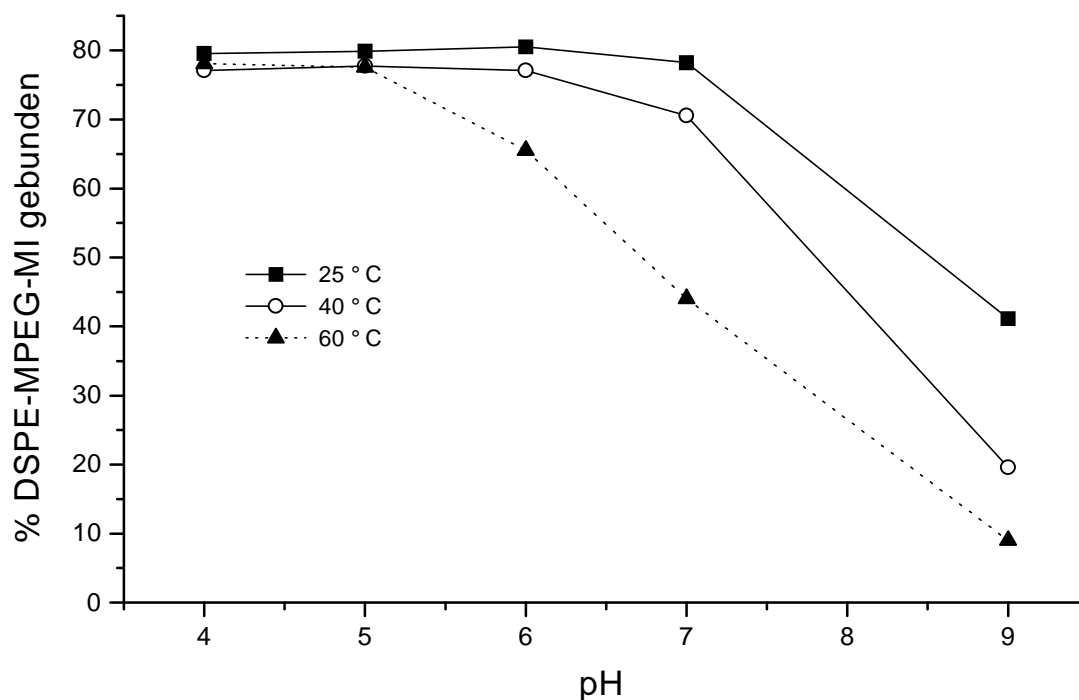


Abbildung 3.32: Stabilität des Linkermoleküls bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen

Bei einer Temperatur von 25 °C sinkt die Kopplungseffizienz oberhalb von pH 7 stark ab; dies entspricht den Angaben für ein anderes Maleimid-Derivat in der Literatur [117]. Wird die Temperatur auf 40 °C erhöht, sinkt die Kopplungsausbeute von pH 6 an ab. Bei 60 °C schließlich ist schon oberhalb von pH 5 eine deutliche Reduktion der gebundenen Menge an DSPE-PEG-MI zu erkennen. Bei diesem Experiment war die Dauer der Temperatureinwirkung deutlich kürzer als bei der Liposomenherstellung; zudem entfielen die ebenfalls stabilitätskritischen Schritte der Extrusion bzw. Ultraschallbehandlung. So kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der Kopplungseffizienz bei der Liposomenherstellung noch deutlich höher ausfällt. Da die Kopplungseffizienz dagegen im schwach sauren Bereich auch bei einer Temperatur von 60 °C kaum beeinflusst wird, wurden alle folgenden Liposomenchargen in einem Puffer mit pH 4,5 hergestellt.

3.3.2.4 Proteinkopplung

Das Ausmaß der Kopplung von thiolisiertem Protein an Liposomen hängt u.a. ab vom Thiolierungsgrad des Proteins, von der Menge an eingesetztem Protein, der Menge an eingesetztem Linkerlipid und der Stabilität des thiolierten Proteins sowie des Linkerlipids. Tabelle 3.15 listet alle mit Protein gekoppelten Liposomenchargen sowie alle für die Kopplung relevanten Parameter auf.

Tabelle 3.15: Kopplung von sulfhydryliertem Protein an Liposomen

Nr.: Liposomencharge (vgl. Tabelle 3.14); Nr_{SH-Prot.}: Proteincharge (vgl. Tabelle 3.13); Protein [μg]: zur Kopplung eingesetzte Proteinmenge; Lipid [μmol]: zur Kopplung eingesetzte Liposomenmenge als Stoffmenge Gesamtlipid; Linker [%]: Menge an DSPE-PEG-MI in den Liposomen in mol%, bezogen auf Gesamtlipid; P [μg/μmol]: gebundene Proteinmenge in μg Protein pro μmol Gesamtlipid; P/L: Anzahl gekoppelter Proteine pro Liposom; % Linker_{geb.}: Anteil an DSPE-PEG-MI der Liposomen, der mit Protein gekoppelt wurde; % Protein_{geb.}: an die Liposomen gekoppelter Proteinanteil

Nr.	Nr _{SH-Prot.}	Protein [μg]	Lipid [μmol]	Linker [%]	P [μg/μmol]	P/L	% Linker _{geb.}	% Protein _{geb.}
7	19	175	2,7	0,60 %	49,9	74	12,4 %	76,9 %
8	19	350	2,7	0,60 %	68,7	102	17,1 %	53,0 %
9	19	700	2,7	0,60 %	83,0	124	20,6 %	32,0 %
10	17	193	2,7	0,60 %	65,6	98	16,3 %	91,7 %
11	17	387	2,7	0,60 %	90,6	135	22,5 %	63,2 %
12	17	774	2,7	0,60 %	97,2	145	24,2 %	33,9 %
13	19	525	8,2	0,35 %	39,7	71	16,9 %	61,9 %
14	19	875	8,2	0,35 %	54,5	98	23,2 %	51,1 %
15	17	581	8,2	0,35 %	30,8	55	13,1 %	43,5 %
16	17	968	8,2	0,35 %	64,0	115	27,3 %	54,2 %
17	19	175	2,1	0,70 %	72,1	129	15,4 %	86,5 %
18	19	350	2,1	0,70 %	70,0	125	14,9 %	42,0 %
19	19	700	2,1	0,70 %	76,1	136	16,2 %	22,8 %
20	17	193	2,1	0,70 %	75,4	135	16,1 %	82,0 %
21	17	387	2,1	0,70 %	82,2	147	17,5 %	44,6 %
22	17	774	2,1	0,70 %	82,3	147	17,5 %	22,3 %
23	19	175	1,2	0,35 %	36,4	65	15,5 %	25,0 %
24	19	350	1,2	0,35 %	44,7	80	19,1 %	15,3 %
25	17	193	1,2	0,35 %	30,4	54	13,0 %	18,9 %
26	17	387	1,2	0,35 %	47,9	86	20,4 %	14,9 %
27	19	175	1,4	0,35 %	37,2	67	15,9 %	29,8 %
28	19	350	1,4	0,35 %	45,7	82	19,5 %	18,3 %
29	17	193	1,4	0,35 %	39,5	71	16,8 %	28,6 %
30	17	387	1,4	0,35 %	46,4	83	19,8 %	16,8 %
31	22	210	2,7	0,35 %	47,0	61	20,0 %	60,4 %
32	22	210	2,6	0,35 %	52,3	83	22,3 %	64,7 %
33	22	210	2,1	0,35 %	49,3	180	21,0 %	49,3 %
34	22	125	1	0,35 %	58,9	343	25,1 %	47,1 %
35	21	205	2,7	0,35 %	60,8	79	25,9 %	80,1 %
36	21	205	2,7	0,35 %	64,2	84	27,4 %	84,6 %
37	21	205	2,7	0,35 %	58,5	76	25,0 %	77,1 %
38	21	205	2,6	0,35 %	67,6	107	28,8 %	85,8 %
39	21	205	2,6	0,35 %	65,8	104	28,1 %	83,4 %
40	21	205	2,6	0,35 %	64,9	103	27,7 %	82,4 %
41	21	205	2,1	0,35 %	54,6	200	23,3 %	55,9 %
42	21	123	1	0,35 %	71,2	415	30,3 %	57,9 %

Nr.	Nr. _{SH-Prot.}	Protein [μ g]	Lipid [μ mol]	Linker [%]	P [μ g/ μ mol]	P/L	% Linker _{geb.}	% Protein _{geb.}
43	22	2090	29	0,70 %	65,0	235	13,9 %	90,2 %
44	21	2055	29	0,70 %	66,0	242	14,1 %	93,1 %
45	22	4180	72	0,20 %	41,1	139	30,6 %	70,7 %
46	21	4110	72	0,20 %	47,6	160	35,5 %	83,3 %
47	22	2090	56	0,20 %	25,3	60	18,9 %	67,9 %
48	21	2055	56	0,20 %	28,6	73	21,3 %	77,9 %

Um die Effizienz der Kopplungsreaktion beurteilen zu können, muss sowohl die auf das Linkerlipid bezogene als auch die auf die Proteinmenge bezogene Kopplungsausbeute betrachtet werden. Abbildung 3.33 zeigt beide Werte für jeweils drei mit BSA bzw. CBSA gekoppelte Liposomenchargen in Abhängigkeit von der Proteinmenge.

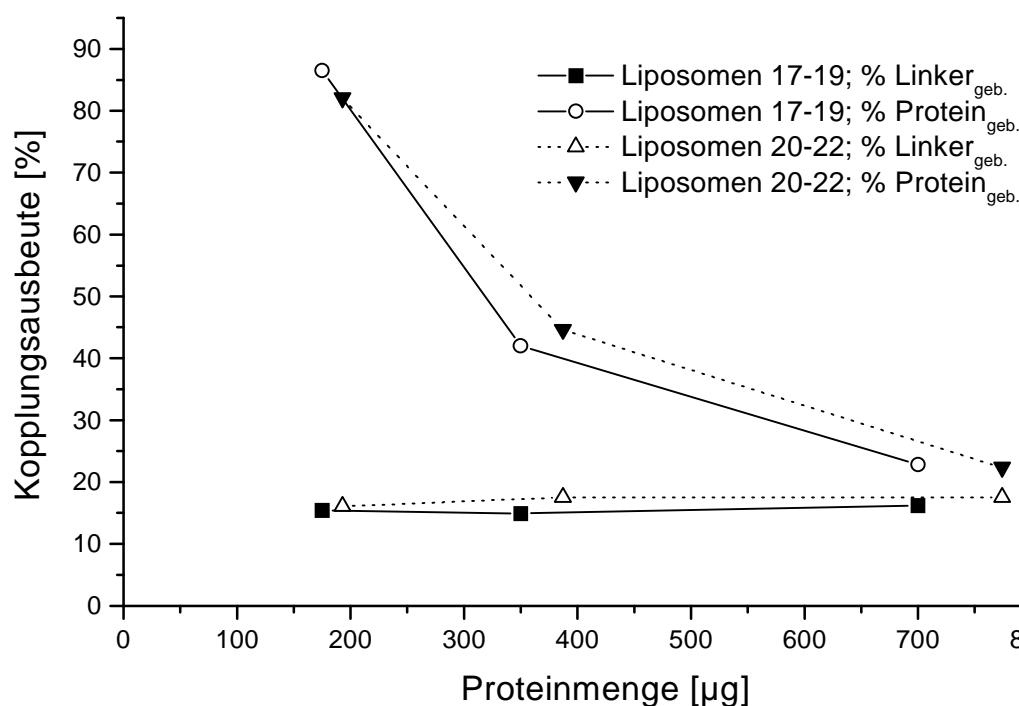


Abbildung 3.33: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute von der Proteinmenge

Die proteinbezogenen Kopplungseffizienzen nehmen mit steigender Proteinmenge ab, wogegen die linkerbezogenen Werte nahezu konstant bleiben. Der limitierende Faktor für die Kopplung ist hier die Menge an Linkerlipid, die nach der Liposomenherstellung noch mit dem thiolierten Protein reagieren kann. Dieser Wert liegt bei den in Abbildung 3.33 dargestellten Chargen bei ca. 15 % und streut bei allen Chargen im Bereich von 12,4 % bis 35,5 % (Tabelle 3.15). Diese Größe ist u.a. abhängig von der Linkerstabilität unter den Herstellungsbedingungen (vgl. 3.3.2.3) und dem Vesikeldurchmesser bzw. der Vesikellamellarität. Bei unilamellaren Liposomen befinden sich ca. 50 % der Gesamtlinkermenge auf der

Liposomenaußenseite. Somit steht maximal die Hälfte des Linkers zur Proteinkopplung zur Verfügung. Mit steigendem multilamellarem Charakter der Vesikel sinkt dieser Anteil weiter ab. Dies ist bei der linkerbezogenen Kopplungseffizienz zu berücksichtigen. Die proteinbezogene Kopplungsausbeute erreicht bei kleinen Proteinmengen Werte von ca. 90 %. Daraus folgt, dass ein geringer Thiolierungsgrad von max. 1,8 SH-Gruppen pro Protein (vgl. Tabelle 3.13) ausreicht, um Albumin bzw. kationisiertes Albumin nahezu quantitativ an die Liposomen zu koppeln, wenn eine ausreichende Menge an Linkerlipid zur Verfügung steht. Insgesamt wird deutlich, dass die Kopplungsreaktion am besten gesteuert werden kann, indem Liposomen mit einer bestimmten Linkerlipidmenge unter definierten Bedingungen hergestellt und mit einem Überschuss an thioliertem Protein gekoppelt werden.

Die Abtrennung von nicht gebundenem Protein gelang mit Hilfe der präparativen Größenausschlusschromatographie (vgl. 2.5.4) zuverlässig. Abbildung 3.34 stellt die gemessenen Absorptionen der Fraktionen eines Laufs dar.

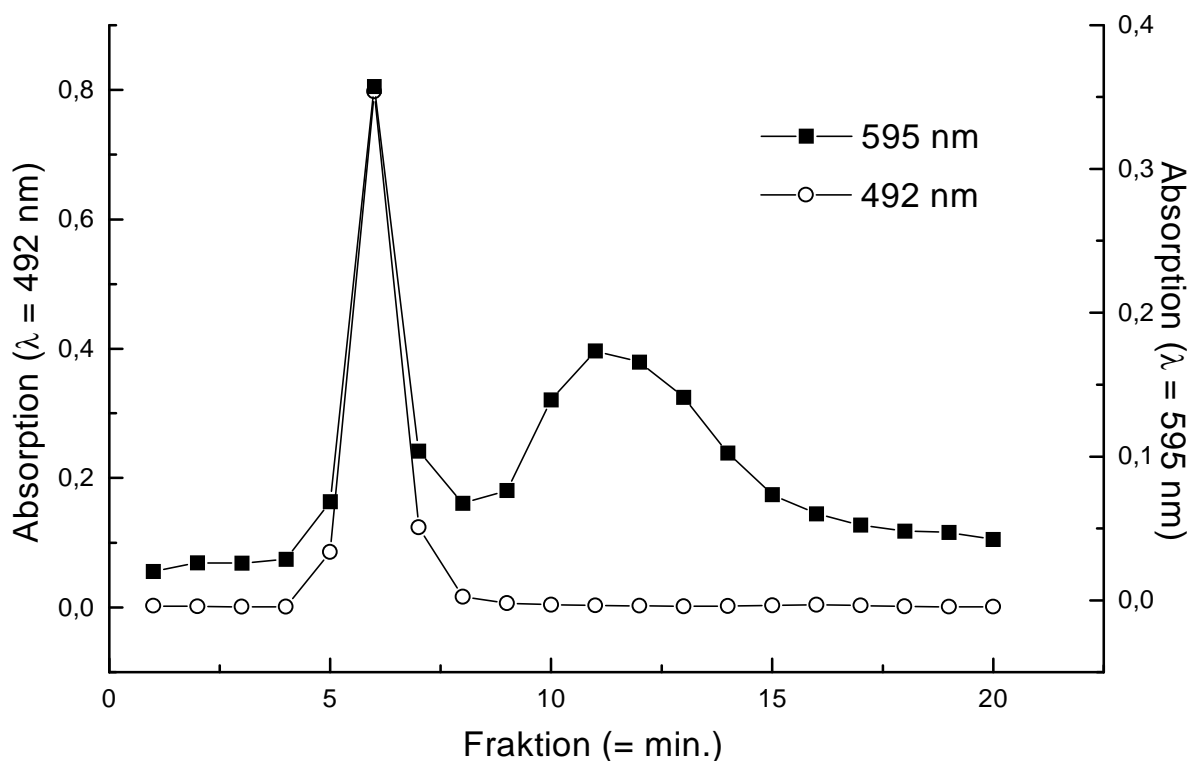


Abbildung 3.34: Abtrennung von nicht gebundenem Protein von CBSA-konjugierten Liposomen (Charge 21) durch Gelfiltration über eine Sepharose CL-6B Säule

Die Absorption bei 492 nm zeigt die Elution von liposomalem CF, das von der Säule nicht retardiert wird. Die Absorption bei 595 nm zeigt das Elutionsprofil des Proteins. Der erste Peak, der synchron mit dem Peak von CF auftritt, repräsentiert die bei dieser Charge an die Liposomen gekoppelte Proteinmenge. Der zweite Peak zeigt das nicht gekoppelte Protein. CF störte die Detektion des Proteins nicht, da es bei 595 nm nur eine sehr geringe Absorption zeigt.

3.3.2.5 Liposomenstabilität

Die Stabilität der proteingekoppelten Liposomen bei 4 °C in PBS wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen untersucht. Es wurden je zwei mit BSA und mit CBSA gekoppelte Chargen analysiert. Die Untersuchung von Größe, CF-Einschluss und Proteinbindung erfolgte wöchentlich wie in 2.6.5 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.35 bis Abbildung 3.40 dargestellt. Sowohl mit DSPC als Hauptlipidkomponente hergestellte Liposomen als auch auf DMPC basierende Vesikel verändern ihre Größe im untersuchten Zeitraum nicht. Ebenso bleibt die Menge an eingeschlossenem CF und an gebundenem Protein bei allen untersuchten Chargen nahezu konstant. Somit können die liposomalen Konjugate nach der Herstellung mindestens sechs Wochen lang bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne dass sich ihre wesentlichen Eigenschaften verändern.

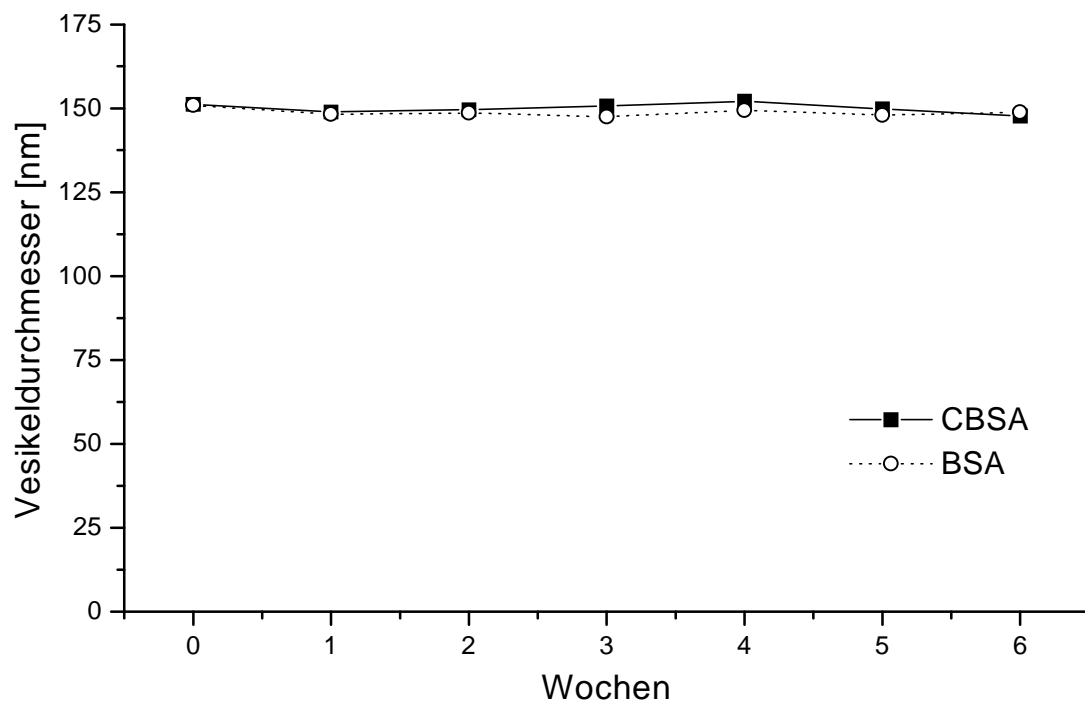


Abbildung 3.35: Stabilität von Liposomen: Vesikeldurchmesser (BSA: Charge 45; CBSA: Charge 46)

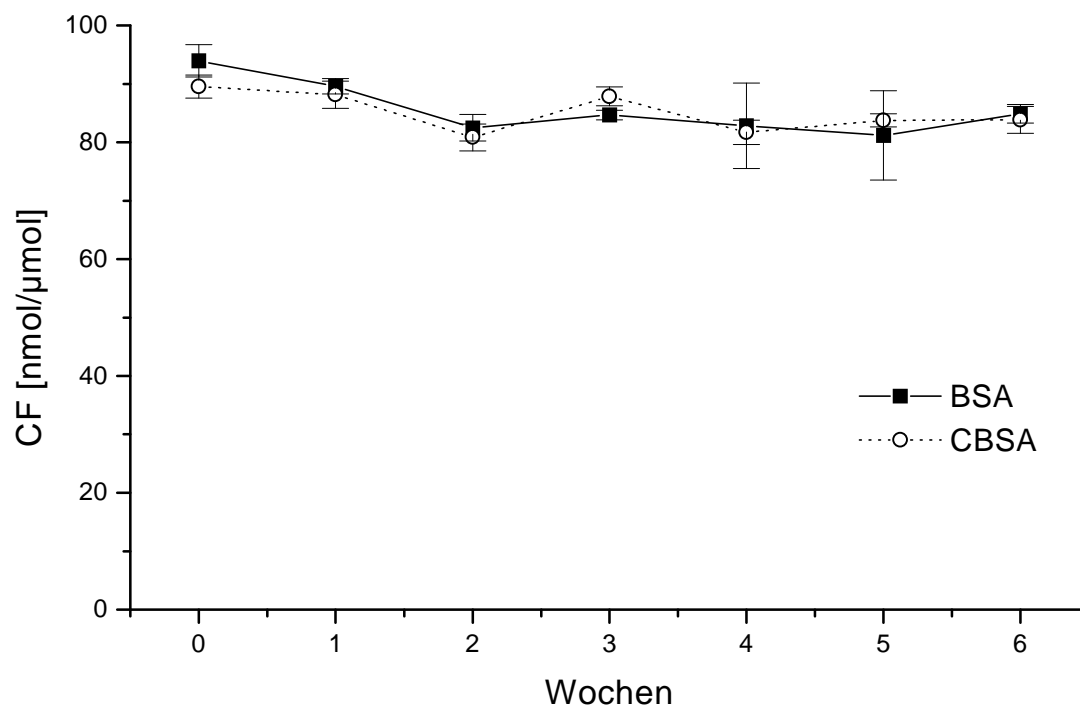


Abbildung 3.36: Stabilität von Liposomen: CF-Einschluss (angegeben in nmol CF pro μmol Gesamtlipid; BSA: Charge 45; CBSA: Charge 46)

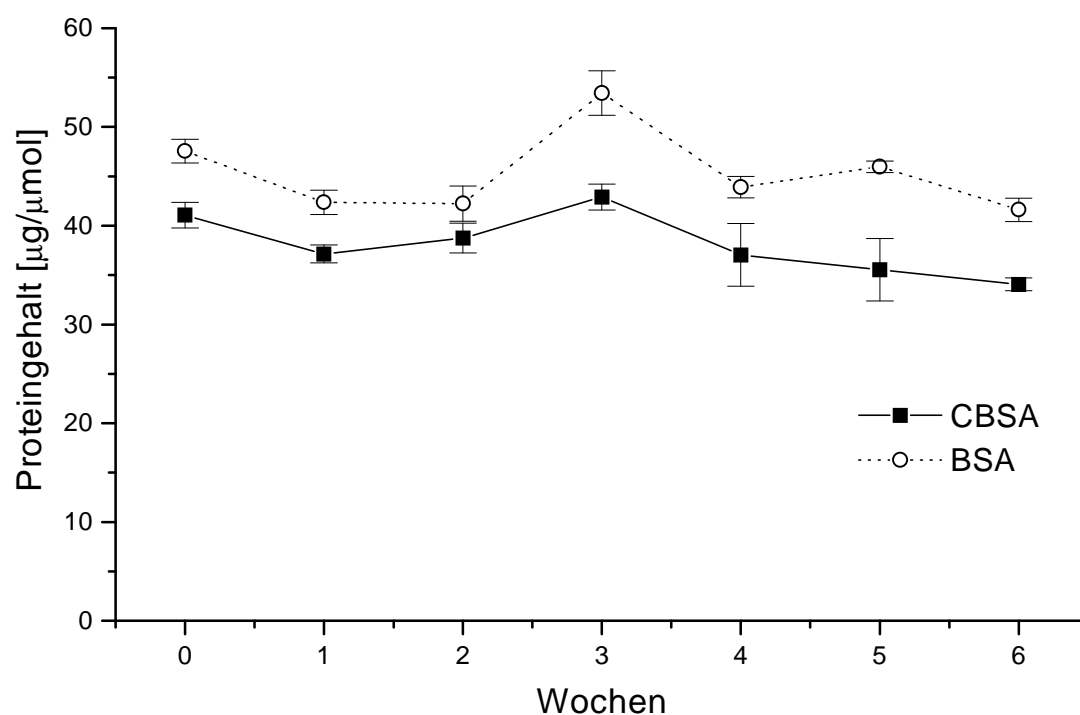


Abbildung 3.37: Stabilität von Liposomen: Proteinkopplung (Proteingehalt angegeben in μg Protein pro μmol Gesamtlipid; BSA: Charge 45; CBSA Charge 46)

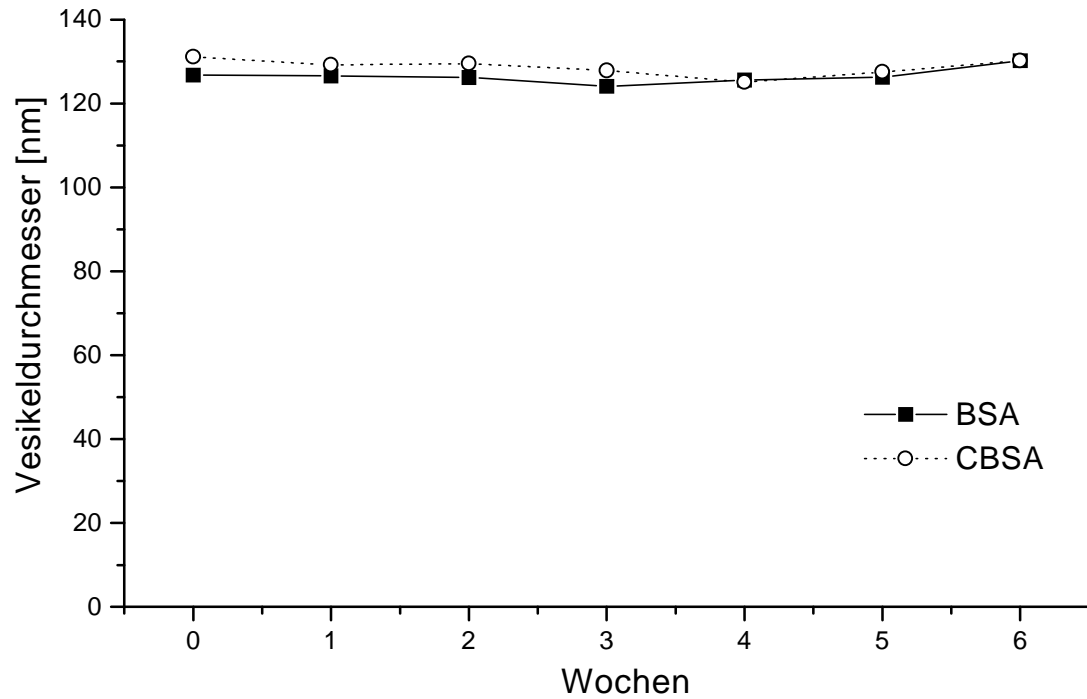


Abbildung 3.38: Stabilität von Liposomen: Vesikeldurchmesser (BSA: Charge 47; CBSA: Charge 48)

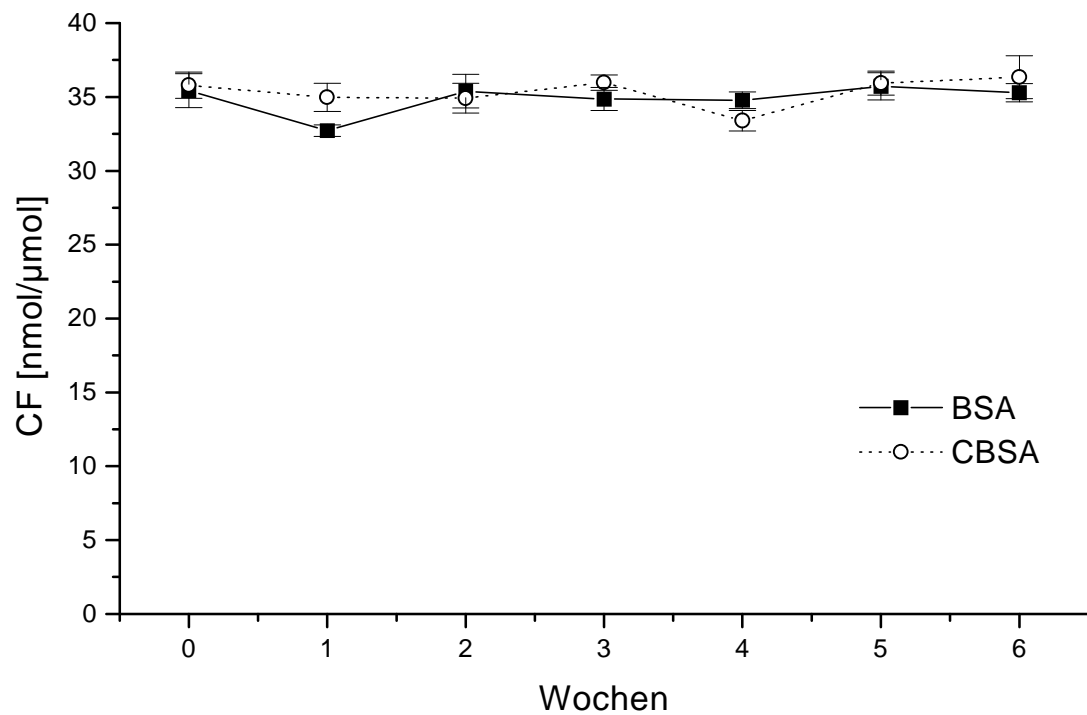


Abbildung 3.39: Stabilität von Liposomen: CF-Einschluss (angegeben in nmol CF pro μmol Gesamtlipid; BSA: Charge 47; CBSA: Charge 48)

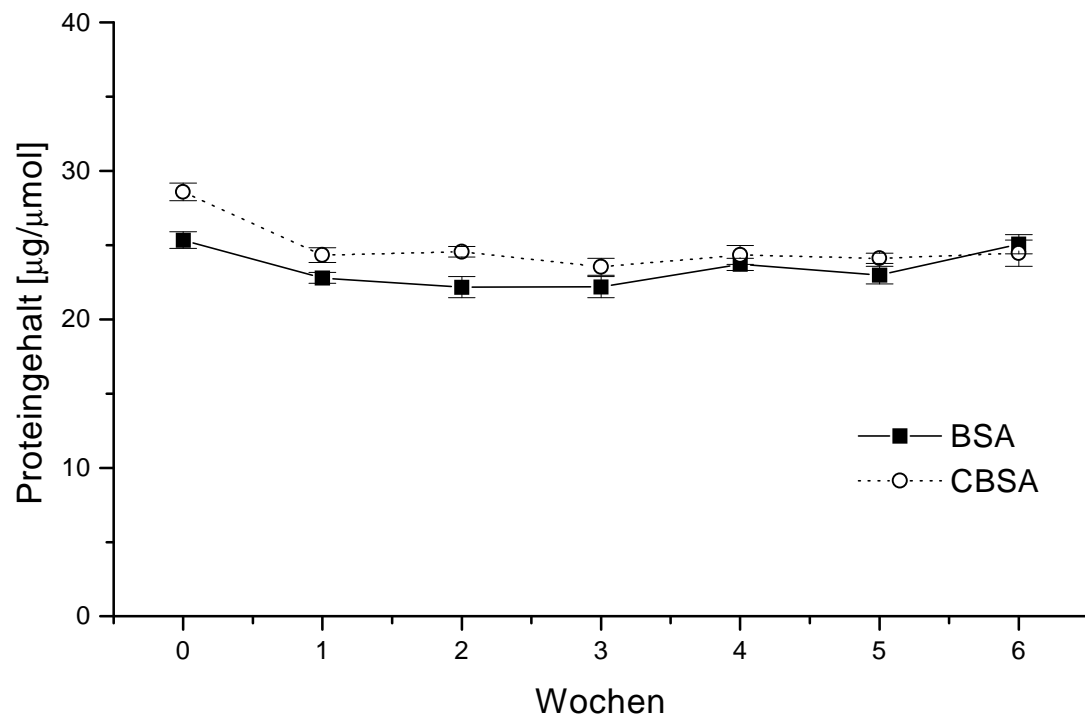


Abbildung 3.40: Stabilität von Liposomen: Proteinkopplung (Proteingehalt angegeben in μg Protein pro μmol Gesamtlipid; BSA: Charge 47; CBSA: Charge 48)

3.3.3 Mikroskopische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit kultivierten Kapillar-Endothelzellen

3.3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Interaktion der hergestellten liposomalen Konjugate mit kultivierten Kapillar-Endothelzellen als *in vitro*-Modell der BHS wurde zunächst mit der konventionellen Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Abbildung 3.41 zeigt BCEC-Monolayer nach der Inkubation mit BSA- und CBSA- gekoppelten Liposomen. Es sind jeweils Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder des gleichen Ausschnittes dargestellt.

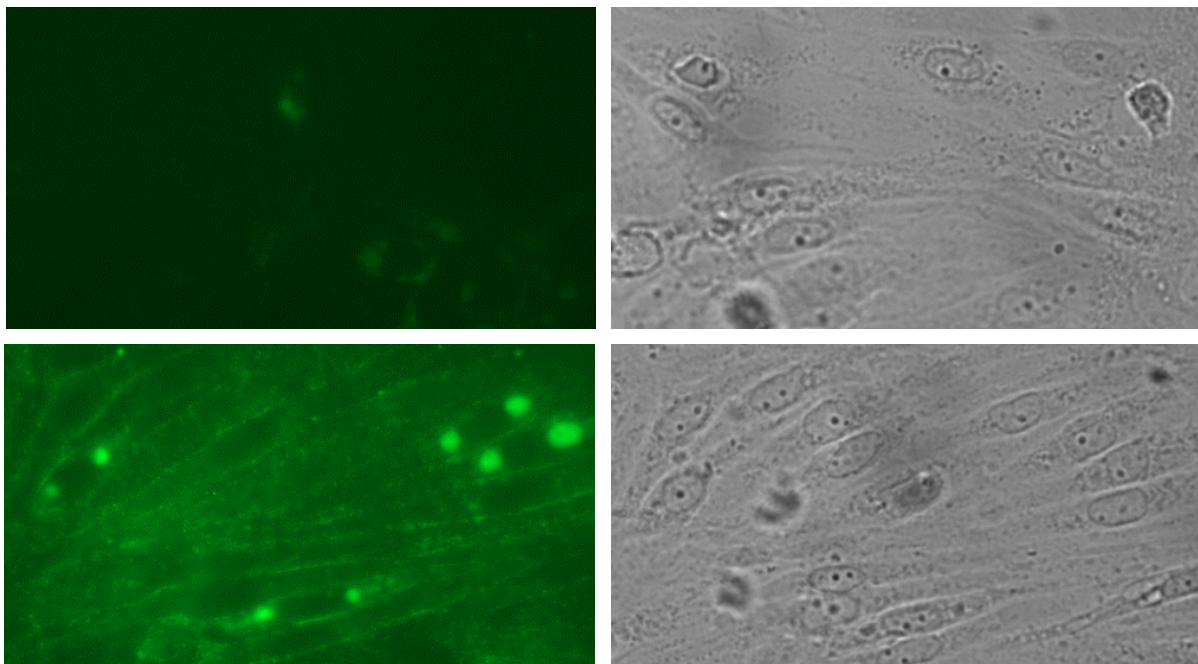


Abbildung 3.41: Inkubation von BCECs mit proteingekoppelten Liposomen; **links:** Fluoreszenz; **rechts:** Phasenkontrast; **oben:** BSA-Liposomen (Charge 9; 30 min. Lipidkonzentration 100 nmol/ml); **unten:** CBSA-Liposomen (Charge 12; 30 min. Lipidkonzentration 100 nmol/ml); Abbildungsgröße jeweils $140\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$

Nach der Inkubation mit BSA-Liposomen ist nur eine schwache Fluoreszenz zu erkennen, die nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Dagegen ist die Struktur der Endothelzellen nach der Behandlung mit CBSA-Liposomen auch im Fluoreszenzbild deutlich zu erkennen. Die Fluoreszenz ist diskontinuierlich verteilt. Im Bereich des Zytosols sind viele fluoreszierende Punkte zu erkennen. Hierbei kann es sich aufgrund der Größe jedoch nicht um einzelne Liposomen handeln; vielmehr sind dies Zonen auf der Zelloberfläche oder Vesikel in den Zellen, in denen sich die Liposomen angereichert haben.

Die Vermutung, dass es sich auch um intrazelluläre, nach Endozytose entstandene Vesikel handelt, wird dadurch gestützt, dass die Bereiche der Zellkerne im Fluoreszenzbild dunkler erscheinen als die übrigen Zellteile. Bei einer ausschließlichen Lokalisation der Fluoreszenz an der Zelloberfläche wäre dies nicht der Fall.

Um auszuschließen, dass die zelluläre Fluoreszenz durch Aufnahme von freiem CF nach einer Freigabe aus den Liposomen während der Inkubation bedingt ist, wurden BCEC-Monolayer mit CBSA-Liposomen, die sowohl CF als auch Rh-PE als Fluoreszenzmarker enthielten, inkubiert. Abbildung 3.42 zeigt das Erscheinungsbild dieser Zellen mit den Filtersätzen für Grün- und Rotfluoreszenz.

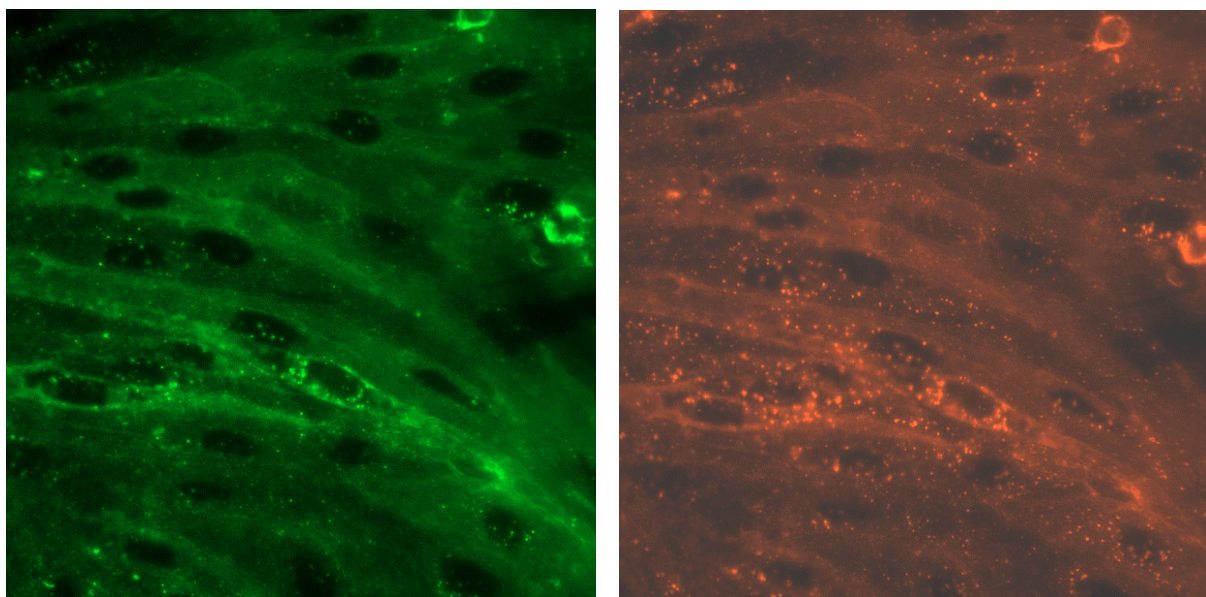


Abbildung 3.42: Inkubation von BCECs mit CBSA-Liposomen der Charge 44 (30 min.; Lipidkonzentration 100 nmol/ml); **links:** Filtersatz für Grünfluoreszenz; **rechts:** Filtersatz für Rotfluoreszenz; Abbildungsgröße jeweils 210 μm \times 210 μm

In beiden Bildteilen treten die Zellkerne als dunkle Zonen in Erscheinung, und das Zytosol ist an den gleichen Stellen mit fluoreszierenden Vesikeln durchsetzt. Die gleichartige Fluoreszenzverteilung lässt darauf schließen, dass die Liposomen als Einheit mit den Zellen in Wechselwirkung treten. Diese Wechselwirkung ist durch die Kopplung mit CBSA bedingt. Bei genauerem Vergleich der beiden Bildteile ist zu erkennen, dass die Zahl der fluoreszierenden Vesikel mit Rh-PE größer ist und diese auch eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen. Dies deutet ebenfalls auf eine Aufnahme der Liposomen durch Endozytose hin, da innerhalb endozytotischer Vesikel der pH-Wert absinkt (vgl. 1.1.3.4.5) und die Fluoreszenz von CF im Gegensatz zu Rh-PE im Sauren stark abnimmt [74].

3.3.3.2 Konfokale Mikroskopie

Da die Lokalisation der Fluoreszenz mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nur eingeschränkt möglich ist, wurden die Interaktionen zwischen den proteingekoppelten Liposomen und den Endothelzellen auch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht. Auch in diesen Experimenten ergab sich mit BSA-gekoppelten Liposomen unter den gewählten Bedingungen (Chargen 23, 24, 27 und 28; Lipidkonzentration bis 200 nmol/ml; Inkubationszeit bis zu 2 h) keine deutliche, zellgebundene Fluoreszenz (nicht dargestellt).

Nach Inkubation der Zellen mit CBSA-Liposomen war jedoch eine deutliche Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 3.43).

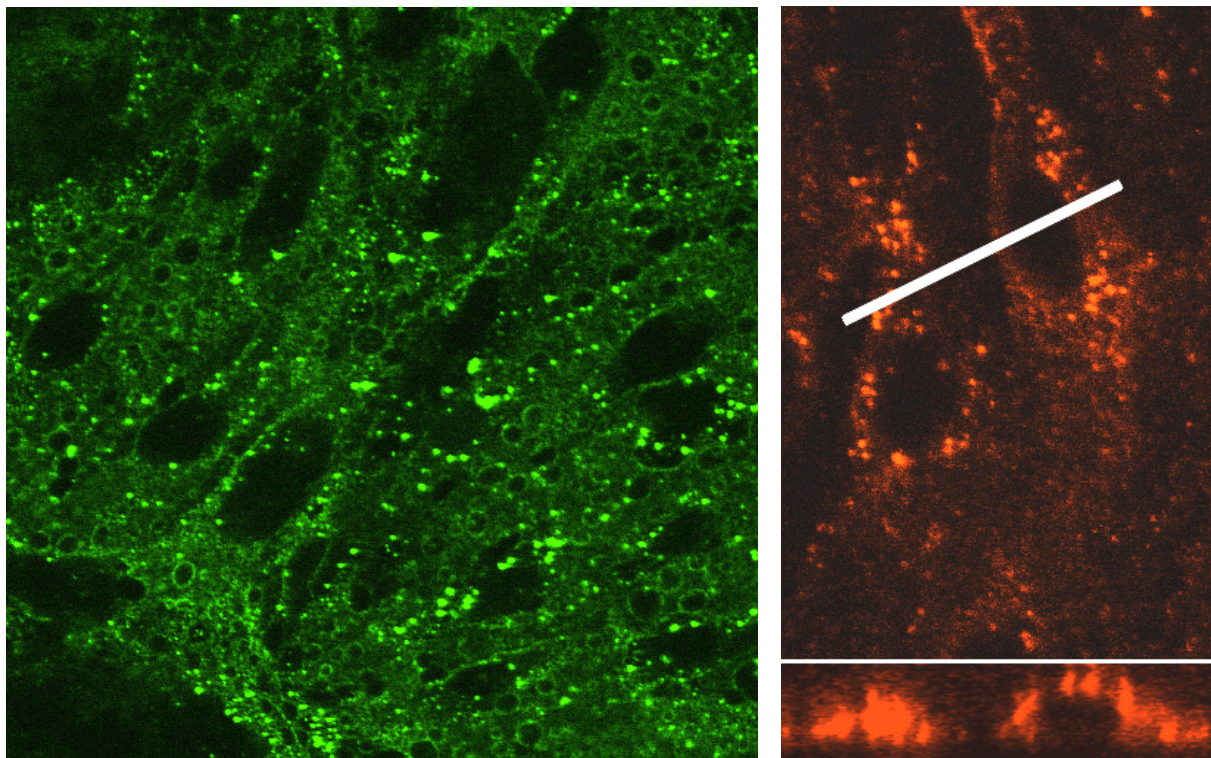


Abbildung 3.43 links: konfokalmikroskopische Aufnahme von BCECs inkubiert mit CBSA-Liposomen; CF als Fluoreszenzmarker; Abbildungsgröße $160\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$; **rechts oben:** konfokalmikroskopische Aufnahme von BCECs inkubiert mit CBSA-Liposomen; Rh-PE als Fluoreszenzmarker; Abbildungsgröße $45\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$; **rechts unten:** Querschnitt durch die beiden Zellen (weiße Linie)

Abbildung 3.43 links zeigt einen Zellmonolayer nach Inkubation mit CF-markierten CBSA-Vesikeln (Charge 26; Inkubationszeit 30 min.; Lipidkonzentration 100 nmol/ml). Die Fluoreszenz ist in den Zellen diskontinuierlich in vesikulären Strukturen verteilt. Die Zellkerne treten als deutlich zu erkennende, große, dunkle, rund-ovale Zonen hervor.

Der obere rechte Teil von Abbildung 3.43 zeigt zwei Endothelzellen nach Inkubation mit Rh-PE markierten CBSA-Liposomen (Charge 30; Inkubationszeit 30 min.; Lipidkonzentration 100 nmol/ml). Neben den dunklen Zellkernen sind wieder fluoreszierende vesikuläre Strukturen zu erkennen, die auf eine Aufnahme der Liposomen in die Zellen hindeuten. Abbildung 3.43 rechts unten zeigt, dass es sich tatsächlich um eine Aufnahme der Liposomen handelt. Hier wurde ausgehend von einer Serie von optischen Schnitten durch dreidimensionale Rekonstruktion ein Querschnitt entlang der weißen Linie in Abbildung 3.43 oben erzeugt. Es ist deutlich sichtbar, dass sich die fluoreszierenden Vesikel über das gesamte Zytosol verteilen und nur der Kern der rechten Zelle ausgespart ist.

Abbildung 3.44 zeigt eine Auswahl der zur Generierung des Querschnittes in Abbildung 3.43 rechts unten verwendeten optischen Schnitte. Die Bildserie beginnt links oben mit einer Schnittebene dicht oberhalb der Zellen. Mit zunehmender Schnitttiefe sind zunächst die Zellkernbereiche zu erkennen. Hier weisen die Endothelzellen die größte Höhe auf. Im weiteren Verlauf der Bildserie sind immer größere Bereiche des Zytosols zu erkennen, bevor mit der letzten Schnittebene ein Bereich unterhalb der Zellen erreicht ist.

Aus den dargestellten Ergebnissen der konventionellen und der konfokalen mikroskopischen Untersuchungen lässt sich feststellen, dass die hergestellten liposomalen Konjugate mit CBSA als Vektor in die als Modell für die BHS verwendeten BCECs aufgenommen werden. Diese Aufnahme ist spezifisch und durch die Kopplung mit CBSA bedingt, da die mit BSA gekoppelten Liposomen keine detektierbare Interaktion mit den Zellen zeigen. Die Fluoreszenzverteilung in den Zellen lässt auf eine Aufnahme durch Endozytose schließen.

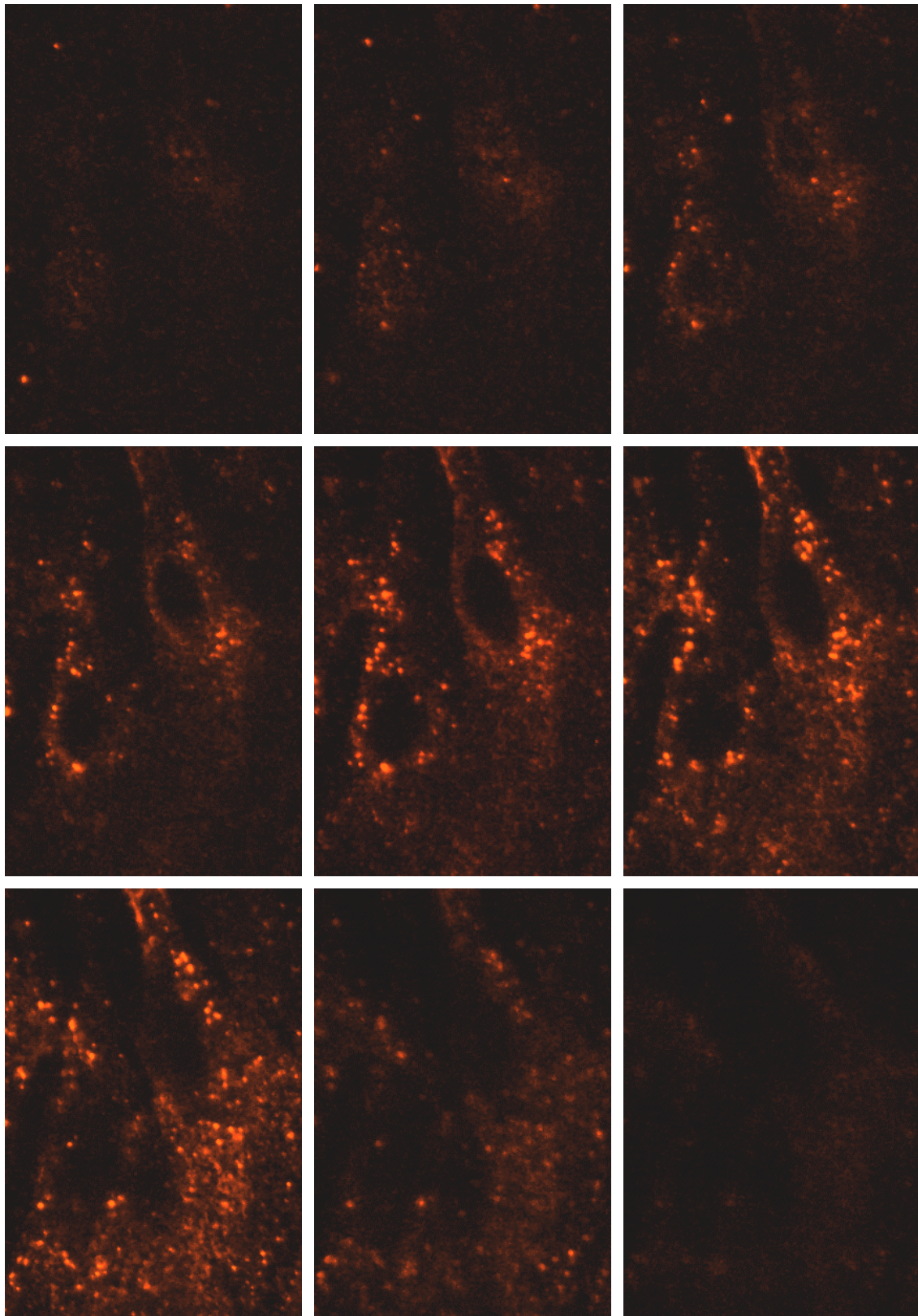


Abbildung 3.44: Serie von optischen Schnitten durch die Endothelzellen aus Abbildung 3.43 (von links oben nach rechts unten); Abstand zwischen zwei Schnittebenen jeweils 1,4 μm

3.3.4 Konfokalmikroskopische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit isolierten Hirnkapillaren

Als weiteres *in vitro*-Modell der BHS wurden funktionell intakte, isolierte Gehirn-Kapillaren verwendet. Dieses Modell hat den Vorteil, dass die Endothelzellen sich noch in der gleichen Anordnung wie im lebenden Organismus befinden und Einflüsse durch die Bedingungen der Zellkultur, wie z.B. Änderungen des Enzymmusters, unterbleiben. Die Kapillaren wurden sowohl mit BSA- als auch mit CBSA-gekoppelten Liposomen inkubiert. Dabei kamen die Fluoreszenzmarker CF und Rh-PE zum Einsatz. Die Inkubation mit BSA-gekoppelten Liposomen (Chargen 23, 24, 27 und 28; Lipidkonzentration bis 200 nmol/ml; Inkubationszeit bis zu 2 h) führte zu keinem detektierbaren kapillarassoziierten Signal (nicht dargestellt). Dagegen resultierte die Inkubation mit CBSA-konjugierten Liposomen in einer deutlichen Fluoreszenz (Abbildung 3.45).

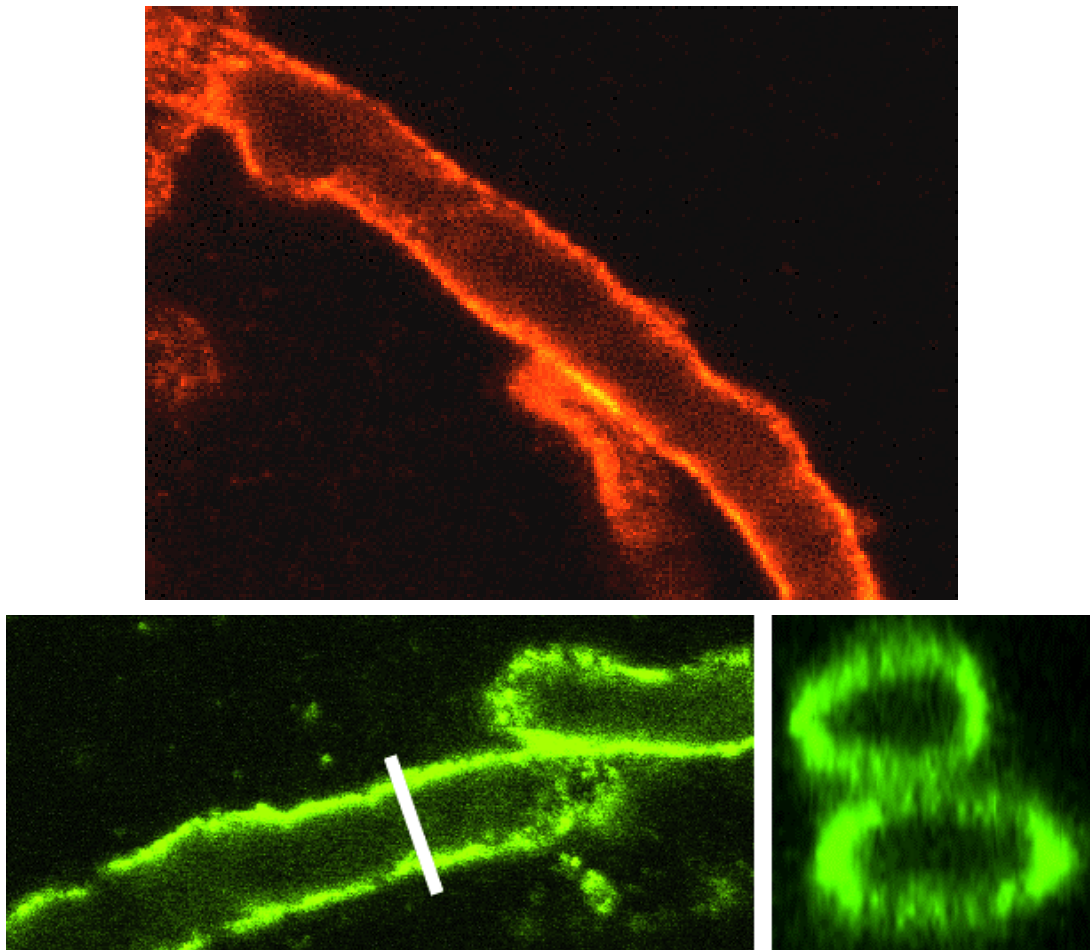


Abbildung 3.45: Konfokalmikroskopische Aufnahme von isolierten Kapillaren inkubiert mit CBSA-Liposomen; **oben:** Rh-PE als Fluoreszenzmarker; Abbildungsgröße: 75 μm \times 55 μm ; **unten links:** CF als Fluoreszenzmarker; Abbildungsgröße: 65 μm \times 30 μm ; **unten rechts:** Querschnitt durch die Kapillare (weiße Linie)

In Abbildung 3.45 oben ist eine Gehirnkapillare nach der Inkubation mit den Rh-PE markierten Liposomen der Charge 30 dargestellt (Inkubationszeit 1 h; Lipidkonzentration 100 nmol/ml). Die den Kapillartubus bildenden Endothelzellen zeigen eine starke diskontinuierliche Fluoreszenz, die auf eine Aufnahme der Liposomen hindeutet. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Inkubation der Kapillaren mit CBSA-Liposomen, die CF als Fluoreszenzmarker enthielten (Abbildung 3.45 unten links; Charge 26; Inkubationszeit 1 h; Lipidkonzentration 100 nmol/ml). Auch hier ist besonders in den Bereichen, in denen die Endothelzellen teilweise in Aufsicht dargestellt sind, die punktuelle Fluoreszenzverteilung zu erkennen. Durch computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion einer Serie von optischen Schnitten durch das Präparat entlang der weißen Linie wurde ein Querschnitt generiert. Abbildung 3.45 unten rechts zeigt die fluoreszierenden „Zellringe“ der zwei an dieser Stelle lokalisierten Kapillaren.

Die Untersuchungen mit den isolierten Kapillaren zeigen somit ebenfalls eine spezifische Interaktion der liposomalen Konjugate mit der BHS, die durch die Kopplung mit CBSA bedingt ist. Die Ergebnisse sind mit denen der Endothelzellen vergleichbar; auch hier liegt eine potenzielle Aufnahme der Liposomen durch Endozytose vor.

3.3.5 Fluorimetrische Untersuchung der Interaktion von liposomalen Konjugaten mit kultivierten Kapillar-Endothelzellen in Mikrotiterplatten

Da eine quantitative Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Bilder aufgrund der Vielzahl an variablen Parametern nur nach umfangreichen Validierungsarbeiten zu objektiv vergleichbaren Ergebnissen führt, wurden die folgenden Untersuchungen zum Mechanismus der Interaktion der liposomalen Konjugate mit der BHS mittels konventioneller Fluorimetrie durchgeführt. Dazu wurden Zellmonolayer in Mikrotiterplatten kultiviert und die zellgebundene Fluoreszenz nach Inkubation mit den Liposomen und anschließender Zelllyse in einem Mikrotiterplattenlesegerät (vgl. 2.7.1.3) gemessen.

3.3.5.1 Linearität der Messmethode

Die mit definierten Liposomenmengen durchgeführte Kalibrierung zeigt die gute Korrelation zwischen den gemessenen Fluoreszenzwerten und der Lipidmenge (Abbildung 3.46). Somit ist aus den Fluoreszenzmessungen der Rückschluss auf die zellgebundene Liposomenmenge möglich.

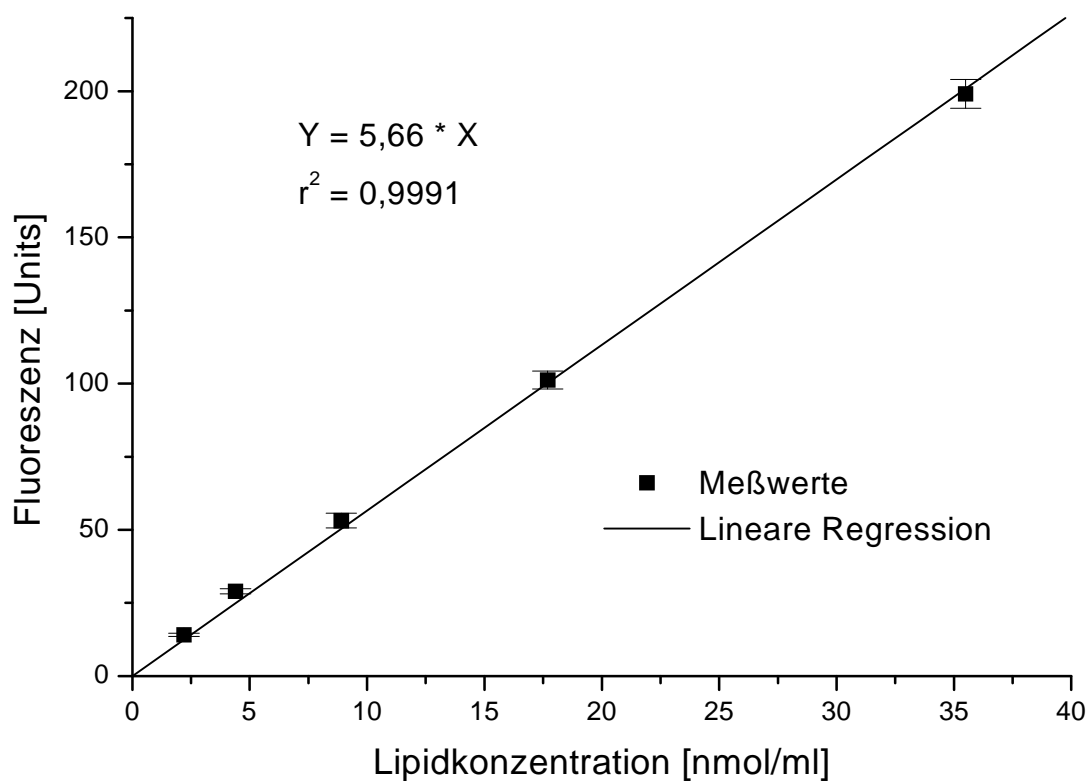


Abbildung 3.46: Fluoreszenz von lysierten Liposomen (Charge 46) in Abhängigkeit von der Lipidmenge

3.3.5.2 Zeitabhängigkeit der Interaktion von CBSA-Liposomen mit BCEC-Monolayern

Abbildung 3.47 zeigt die zellgebundenen Liposomenmengen pro Mikrotiterplatten-Vertiefung über einen Zeitraum von zwei Stunden.

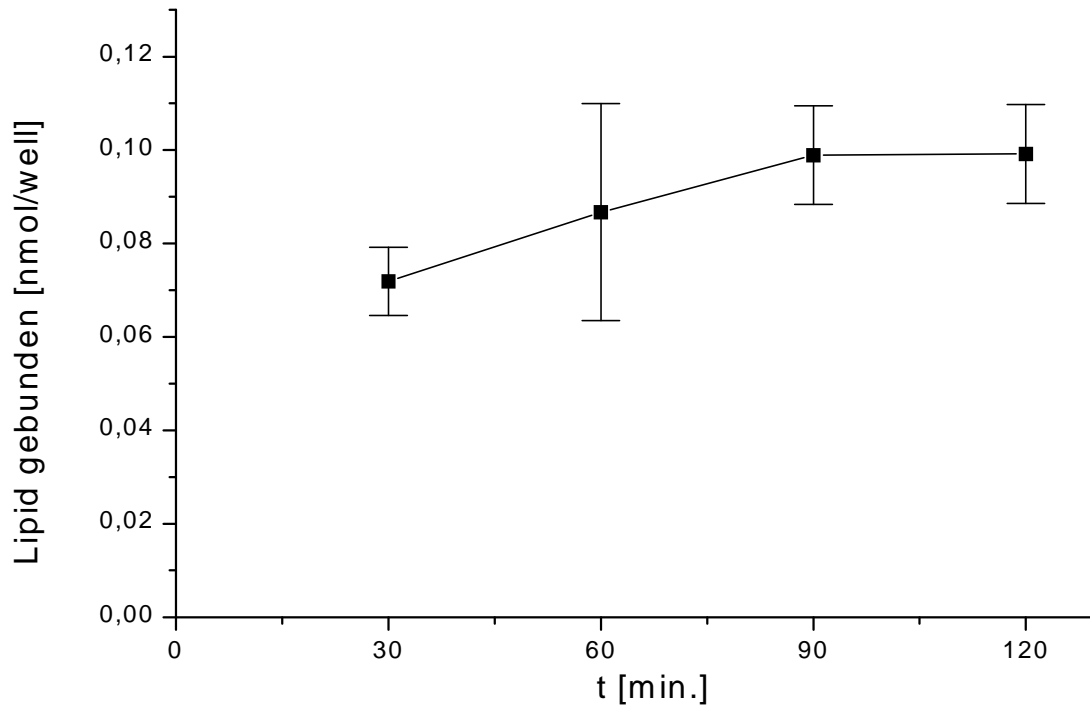


Abbildung 3.47: Zeitabhängigkeit der Interaktion von CBSA-gekoppelten Liposomen mit BCECs (Charge 46; Lipidkonzentration 80 nmol/ml; Einzelwerte siehe Tabelle 5.49)

Bereits nach 30 min. sind mehr als 70 % des Maximalwertes erreicht. Die nach 90 und 120 min. gemessene zellassoziierte Lipidmenge von 0,1 nmol entspricht einem Anteil von 1,3 % der zur Inkubation eingesetzten gesamten Liposomenmenge. Die Versuchsbedingungen erlauben keine Unterscheidung zwischen adsorptiv gebundenen und endozytierten Liposomen. Der hier gemessene zeitliche Verlauf ist prinzipiell mit beiden Prozessen vereinbar.

3.3.5.3 Unterscheidung von Bindung und Aufnahme

Um zwischen zellgebundenen und aufgenommenen Liposomen unterscheiden zu können, wurde ein zusätzlicher Waschschriff mit einer sauren Waschlösung (SP; pH 3) durchgeführt (vgl. 2.7.1.3) [65]. Bei diesem pH-Wert verringert sich die negative Ladung der Zelloberfläche durch die Protonierung von Carboxylfunktionen. Somit reduzieren sich die elektrostatischen Kräfte, die der Bindung von kationisiertem Albumin an die Zelloberfläche zugrunde liegen. In Abbildung 3.48 sind die gemessenen zellgebundenen Lipidmengen pro Mikrotiterplatten-Vertiefung mit und ohne diesen Waschschriff nach ein- bzw. zweistündiger Inkubationszeit dargestellt.

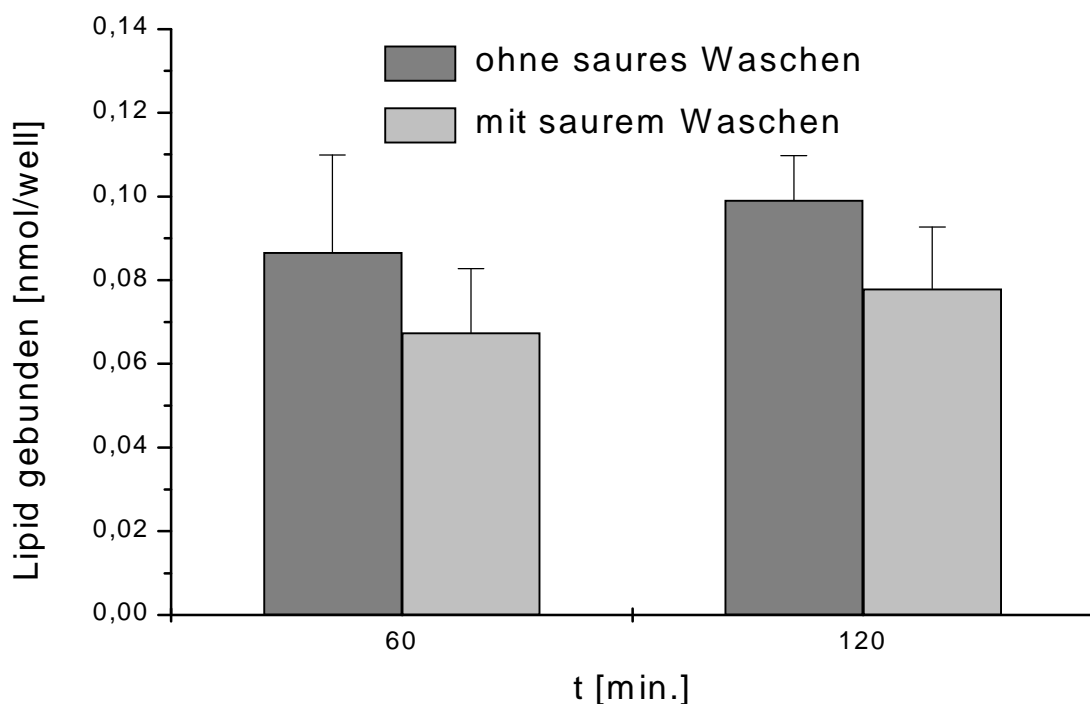


Abbildung 3.48: Einfluss eines sauren Waschpuffers auf die zellgebundene Lipidmenge (Lipidkonzentration 80 nmol/ml; Charge 46; Einzelwerte siehe Tabelle 5.49 und Tabelle 5.50)

Der größte Teil der zellgebundenen Lipidmenge ist dem SP gegenüber resistent (ca. 80 % bei beiden Zeitpunkten). Somit ist der überwiegende Teil der Liposomen in die Zellen aufgenommen worden oder zumindest so fest adsorptiv an die Zelloberfläche gebunden, dass unter den Bedingungen des Waschschriffs keine quantitative Desorption erfolgt.

3.3.5.4 Abhängigkeit von der Vesikelgröße

Bedingt durch die beiden Herstellungsmethoden kamen für die einzelnen Untersuchungen Liposomen mit unterschiedlicher Vesikelgröße zum Einsatz. Um den Einfluss des Liposomendurchmessers auf die zelluläre Aufnahme zu ermitteln, wurden Liposomen durch Membranen unterschiedlicher Porenweite extrudiert. Diese Liposomen wiesen abgesehen von der Größe weitgehend übereinstimmende Parameter auf (vgl. Tabelle 3.15). Die aufgenommenen Lipidmengen (% der eingesetzten Gesamtmenge) wurden zu der aufgenommenen Lipidmenge der Liposomen mit 122 nm Durchmesser in Relation gesetzt (Abbildung 3.49).

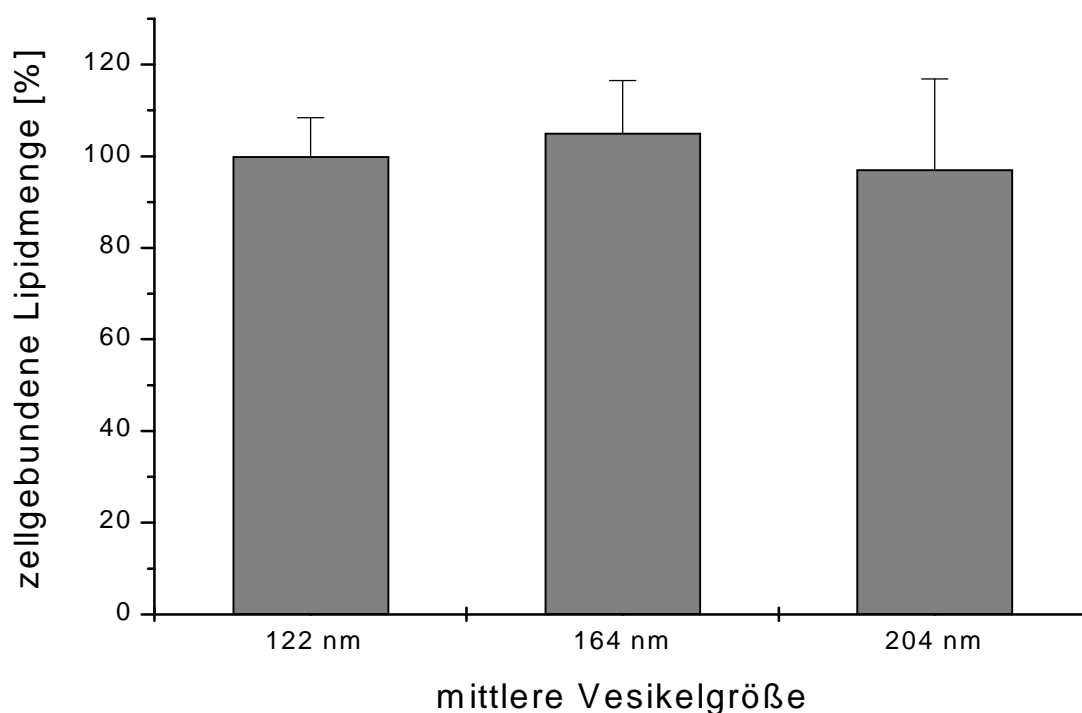


Abbildung 3.49: Einfluss der Vesikelgröße auf die Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer (Lipidkonzentration 100 nmol/ml; Chargen 40 bis 42; Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; Einzelwerte siehe Tabelle 5.51)

Im untersuchten Größenbereich ist kein Unterschied in der Aufnahme der CBSA-gekoppelten Liposomen festzustellen. Somit sind keine größenbedingten Unterschiede in der Aufnahme beschallter und extrudierter Vesikel zu erwarten.

3.3.5.5 Inhibition der Interaktion zwischen CBSA-Liposomen und BCECs

Die in den mikroskopischen Untersuchungen festgestellte Interaktion zwischen Liposomen und Endothelzellen ist durch die Kopplung mit CBSA bedingt. Somit sollte diese Interaktion durch Zugabe von freiem CBSA kompetitiv gehemmt werden können. Wenn die Aufnahme der Liposomen in die Zellen durch Endozytose bedingt ist, sollte sich diese durch Behandlung der Zellen mit Endozytosehemmstoffen blockieren lassen. In Abbildung 3.50 ist der Einfluss von freiem CBSA und von verschiedenen Endozytosehemmstoffen auf die Liposom-Zell-Interaktionen dargestellt.

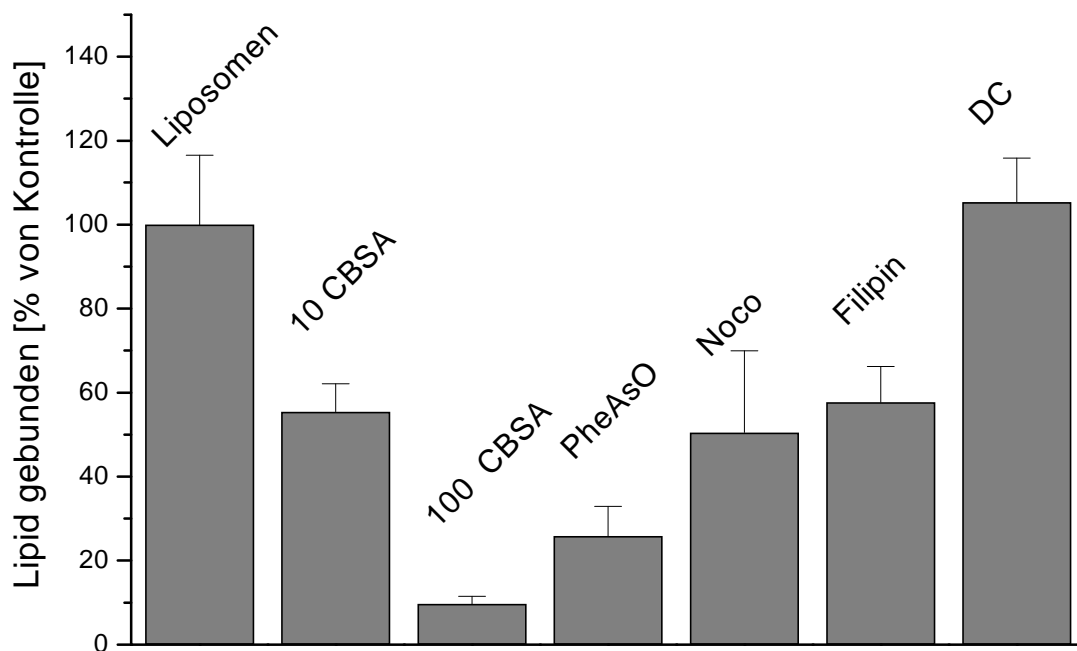


Abbildung 3.50: Hemmung der Aufnahme von CBSA-Liposomen (Charge 46) in BCECs (Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; Lipidkonzentration 80 nmol/ml entsprechend ca. 4 µg/ml CBSA; Liposomen = Kontrolle; 10 CBSA = 40 µg/ml CBSA⁶; 100 CBSA = 400 µg/ml CBSA⁶; PheAsO = Phenylarsinoxid 20 µM⁷; Noco = Nocodazol 4 µM⁷; Filipin = Filipin 3 µg/ml⁸; DC = Dansylcadaverin 100 µM⁸; Einzelwerte siehe Tabelle 5.52)

Die Inkubation von BCEC-Monolayern in Gegenwart von steigenden Mengen an freiem CBSA resultiert in einer steigenden Abnahme der messbaren zellgebundenen Liposomenmenge.

⁶ nur bei der Inkubation mit den Liposomen zugesetzt

⁷ bei Vorinkubation und bei Inkubation mit den Liposomen zugesetzt

⁸ nur bei Vorinkubation zugesetzt

Diese Reduktion ist auf eine Kompetition zwischen zugesetztem und liposomengebundenem Protein zurückzuführen. Allerdings ist die zehnfache Menge an freiem CBSA nötig, um die zelluläre Fluoreszenz auf die Hälfte des Kontrollwertes zu senken.

Die Inkubation in Gegenwart von Phenylarsinoxid, einem Zellgift, das alle aktiven zellulären Prozesse und somit auch die Endozytose hemmt [95, 190, 205], führt ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der gebundenen Liposomenmenge. Da die Bindung an die Zelloberfläche allein kein energieverbrauchender Prozess ist, kann hieraus auf eine Aufnahme der Liposomen in die Zellen geschlossen werden. Die Bindung bzw. Aufnahme lässt sich ebenfalls durch Zugabe von Nocodazol teilweise blockieren. Nocodazol ist eine Substanz, die die Aggregation von Mikrotubuli und somit den intrazellulären Vesikeltransport reversibel hemmt [46, 63, 76, 110, 165]. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine Aufnahme der Liposomen durch Endozytose hin.

Einen ähnlich deutlichen Effekt wie Nocodazol bewirkt die Vorinkubation mit Filipin. Filipin hemmt die Endozytose selektiv in bestimmten Regionen der Zelloberfläche [43, 93, 176], den sogenannten *caveolae* (vgl. 1.1.3.4.3). Im Gegensatz dazu zeigt die Vorinkubation der Zellmonolayer mit Dansylcadaverin keinen Effekt. Dansylcadaverin hemmt die Endozytose über *coated pits* (vgl. 1.1.3.4.3) [70, 129, 195] durch Hemmung der Transglutaminase, die für die Bildung der *coated pits* essenziell ist [38].

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass CBSA-gekoppelte Liposomen in Analogie zum freien CBSA durch adsorptive Endozytose in die Endothelzellen der BHS aufgenommen werden. Im Gegensatz zu vielen rezeptorvermittelten Prozessen (vgl. 1.1.3.4.1) scheint diese Aufnahme unabhängig von der Bildung von *coated pits* zu verlaufen, sondern vielmehr an die Präsenz von *caveolae* gebunden zu sein.

3.3.5.6 Abhängigkeit der Aufnahme von der Liposomenkonzentration

Die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von CBSA-gekoppelten Liposomen in BCEC-Monolayer ist in Abbildung 3.51 dargestellt. Der eingesetzte Abbildungsteil zeigt den unteren Konzentrationsbereich in einer angepassten Skalierung.

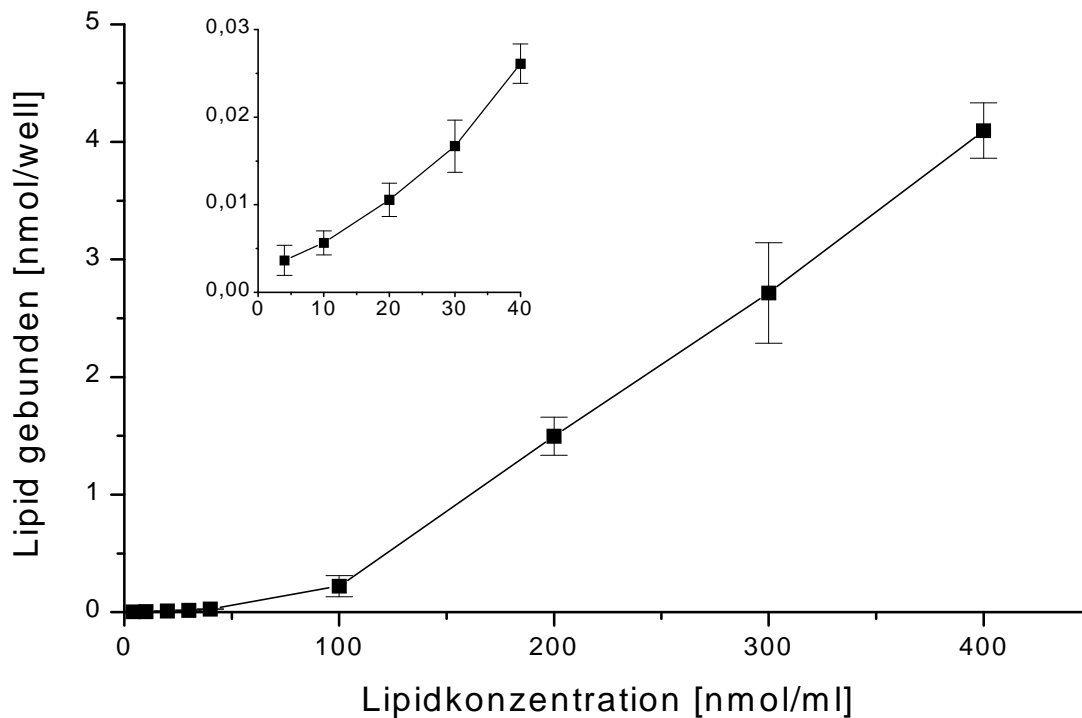


Abbildung 3.51: Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCECs; Abhängigkeit von der Liposomenkonzentration (Charge 46; nach Behandlung mit SP; Inkubationszeit 1 h; Einzelwerte siehe Tabelle 5.53)

Im niedrigen Konzentrationsbereich von 10 bis 100 nmol/ml Lipid (entsprechend 0,5 bis 5 µg/ml CBSA bei der eingesetzten Liposomencharge) ergibt sich ein annähernd exponentieller Anstieg der zellgebundenen Liposomenmenge, der bei höheren Lipidkonzentrationen in einen nahezu linearen Verlauf übergeht. Dies kann bedeuten, dass eine Mindestkonzentration erforderlich ist, um den zytotischen Prozess auszulösen. Eine weitere, wenn auch aufgrund der Größe der Liposomen unwahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit für das beobachtete Ergebnis wäre der Rücktransport der aufgenommenen Liposomen durch ein spezielles Transportprotein, wie z.B. PGP oder MRP (vgl. 1.1.3.3).

3.3.5.7 Beeinflussung der Aufnahme von CBSA-konjugierten Liposomen in BCEC-Monolayer durch PGP-/MRP-Substraten sowie durch CBSA

Um zu untersuchen, ob und inwieweit die Aufnahme von CBSA-gekoppelten Liposomen von den an der BHS vorkommenden Exportproteinen beeinflusst wird, wurden BCEC-Monolayer mit CBSA-gekoppelten Liposomen in Gegenwart von verschiedenen PGP- bzw. MRP-Substraten inkubiert. Ebenso wurde der Einfluss einer geringen Konzentration von CBSA, die in etwa der an die Liposomen gebundenen Proteinmenge entsprach, untersucht (Abbildung 3.52).

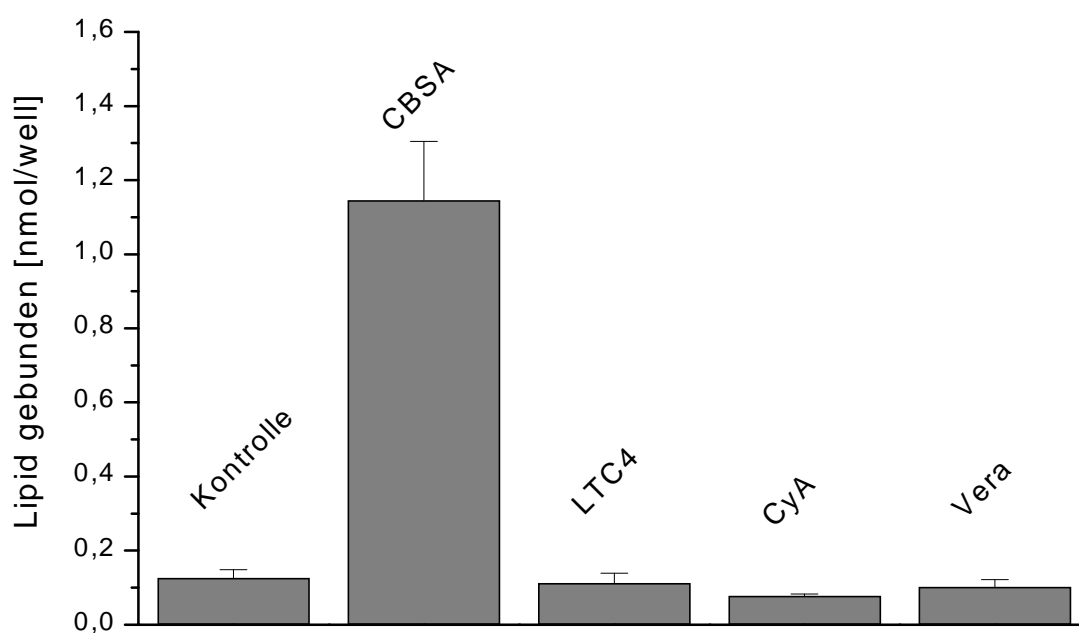


Abbildung 3.52: Abhängigkeit der Aufnahme von CBSA-Liposomen von CBSA und verschiedenen PGP-/MRP-Inhibitoren (Charge 46; Lipidkonzentration jeweils 80 nmol/ml (entsprechend ca. 4 µg/ml CBSA); Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; CBSA: 5 µg/ml; LTC₄: Leukotrien C₄ 0,5 µM; CyA: Cyclosporin A 10 µM; Vera: Verapamil 50 µM; Einzelwerte siehe Tabelle 5.54)

Keines der untersuchten PGP-/MRP-Substrate hat einen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme der CBSA-konjugierten Liposomen. Somit scheidet eine Affinität der Liposomen zu einer dieser Effluxpumpen als Erklärung für die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit aus.

Dagegen hat der Zusatz von freiem CBSA in einer Konzentration von 5 µg/ml einen Anstieg der aufgenommenen Liposomenmenge auf das Zehnfache zur Folge. Somit bewirkt freies CBSA in niedriger Konzentration eine erhöhte, in hohen Konzentrationen (vgl. 3.3.5.5) jedoch eine reduzierte Aufnahme der CBSA-konjugierten Liposomen.

3.3.5.8 Einfluss von BSA und CBSA auf die konzentrationsabhängige Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer

Um den aufnahmeerhöhenden Effekt von CBSA genauer zu charakterisieren, wurden drei verschiedene Liposomenkonzentrationen mit und ohne CBSA inkubiert. Außerdem sollte der Einfluss von nativem Serumalbumin auf die Aufnahme untersucht werden (Abbildung 3.53).

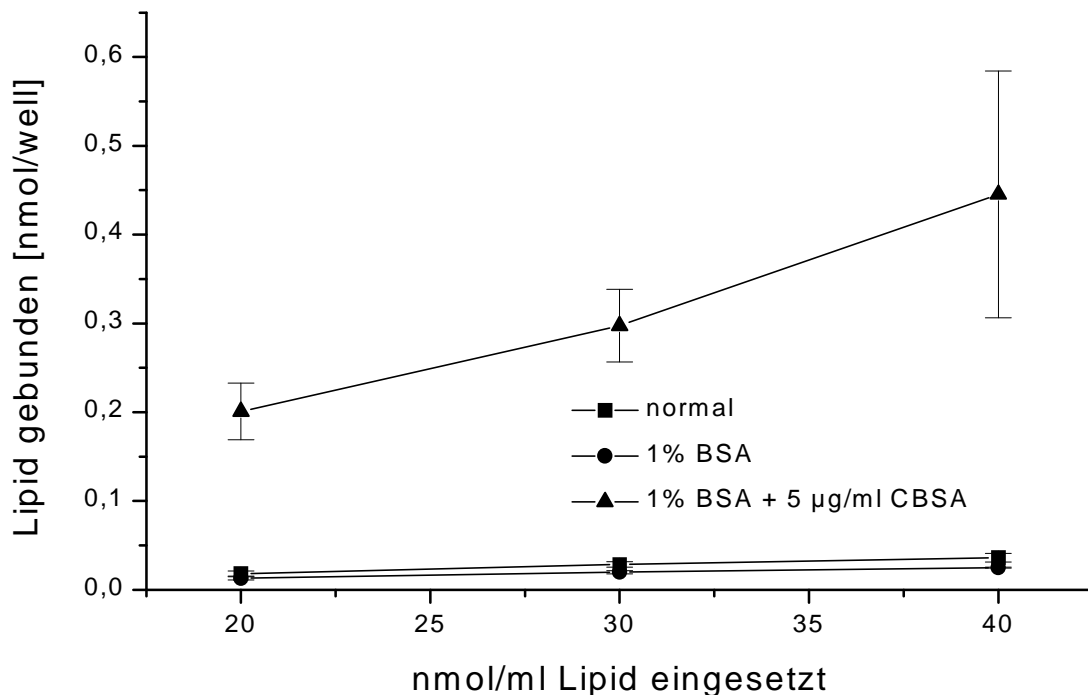


Abbildung 3.53: Abhängigkeit der Aufnahme von CBSA-Liposomen von BSA und CBSA (Charge 46; Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; Einzelwerte siehe Tabelle 5.55 bis Tabelle 5.57)

Auch in dieser Versuchsreihe bewirkt CBSA bei allen untersuchten Liposomenkonzentrationen einen Anstieg der aufgenommenen Liposomenmenge auf das Zehnfache. Natives Albumin dagegen bewirkt eine Reduktion der aufgenommenen Liposomenmenge um ca. 20 %. Es ist naheliegend zu vermuten, dass BSA an die Zelloberfläche adsorbiert und somit die Aufnahme der CBSA-Liposomen leicht behindert. Bei dieser Beobachtung ist zu beachten, dass die zugesetzte BSA-Menge deutlich über der Menge des liposomengebundenen CBSA liegt (Faktor 5000 bis 10000); somit wird deutlich, dass auch durch die Präsenz von Serumproteinen keine besonders ausgeprägte Reduktion der Aufnahme der Liposomen zu erwarten ist.

3.3.5.9 Einfluss von CBSA auf die Aufnahme verschiedener Liposomentypen

Um zu untersuchen, ob der durch niedrige Konzentrationen an zugesetztem CBSA hervorgerufene Effekt einer gesteigerten Aufnahme durch eine spezifische Interaktion mit CBSA-konjugierten Liposomen bedingt oder eher unspezifisch ist, wurden BCEC-Monolayer mit verschiedenen Liposomentypen mit und ohne CBSA-Zusatz inkubiert (Abbildung 3.54).

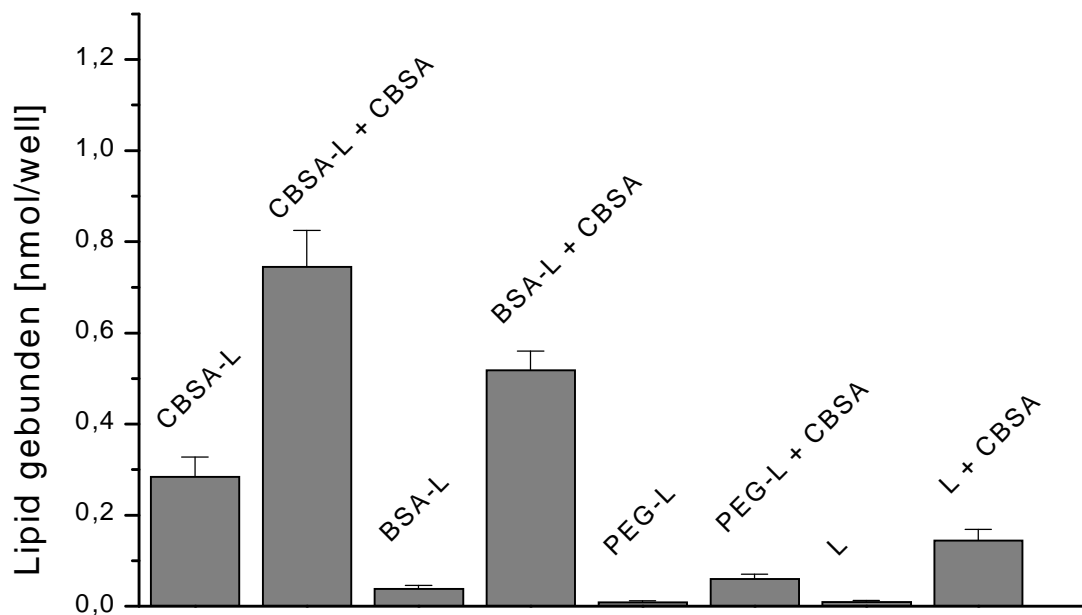


Abbildung 3.54: Beeinflussung der Aufnahme von verschiedenen Liposomentypen durch CBSA (CBSA-L: CBSA-konjugierte Liposomen; Charge 46; BSA-L: BSA-konjugierte Liposomen; Charge 45; PEG-L: PEG-Liposomen; Charge 49; L: Liposomen ohne PEG; Charge 50; Lipidkonzentration jeweils 80 nmol/ml; CBSA: CBSA 5 µg/ml; Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; Einzelwerte siehe Tabelle 5.58)

Die Werte ohne CBSA-Zusatz zeigen, dass unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß nur die mit CBSA-konjugierten Liposomen in nennenswertem Ausmaß in die Endothelzellen aufgenommen werden. Der Zusatz von freiem CBSA bewirkt jedoch bei allen untersuchten Liposomentypen einen deutlichen Anstieg der aufgenommenen Liposomenmengen.

Als Ursache hierfür kommen Änderungen der Oberflächeneigenschaften von Liposomen oder / und Zellen durch Adsorption des freien Proteins in Betracht. Somit wäre es denkbar, dass kationisiertes Albumin an die Liposomen adsorbiert und die beobachtete Aufnahme auf dem gleichen Effekt beruht wie die Aufnahme von CBSA-konjugierten Liposomen. Allerdings bliebe dabei unklar, wieso auch CBSA-konjugierte Liposomen nach Zusatz von freiem CBSA besser in die Zellen aufgenommen werden.

Andererseits ist denkbar, dass CBSA an den Endothelzellen eine Stimulation von unspezifischen Aufnahmeprozessen bewirkt. Ähnliche Effekte durch positiv geladene Proteine wurden z.B. für Poly-D-Lysin und Poly-L-Lysin beschrieben [48]; diese induzieren eine erhöhte Pinozytoseaktivität in Makrophagen. Ebenso erhöht das lysinreiche Histon die Permeabilität von nativem Albumin an der BHS auf das Vierfache [158].

3.3.5.10 Einfluss von CBSA auf die Aufnahme von verschiedenen Pinozytoseindikatoren

Um zu untersuchen, ob der Zusatz von CBSA eine generelle unspezifische Aufnahme von Substanzen bewirkt, wurden BCEC-Monolayer mit verschiedenen fluoreszierenden Substanzen, die normalerweise nicht in nennenswertem Ausmaß in die Zellen aufgenommen werden, mit und ohne Zusatz von CBSA inkubiert (Abbildung 3.55).

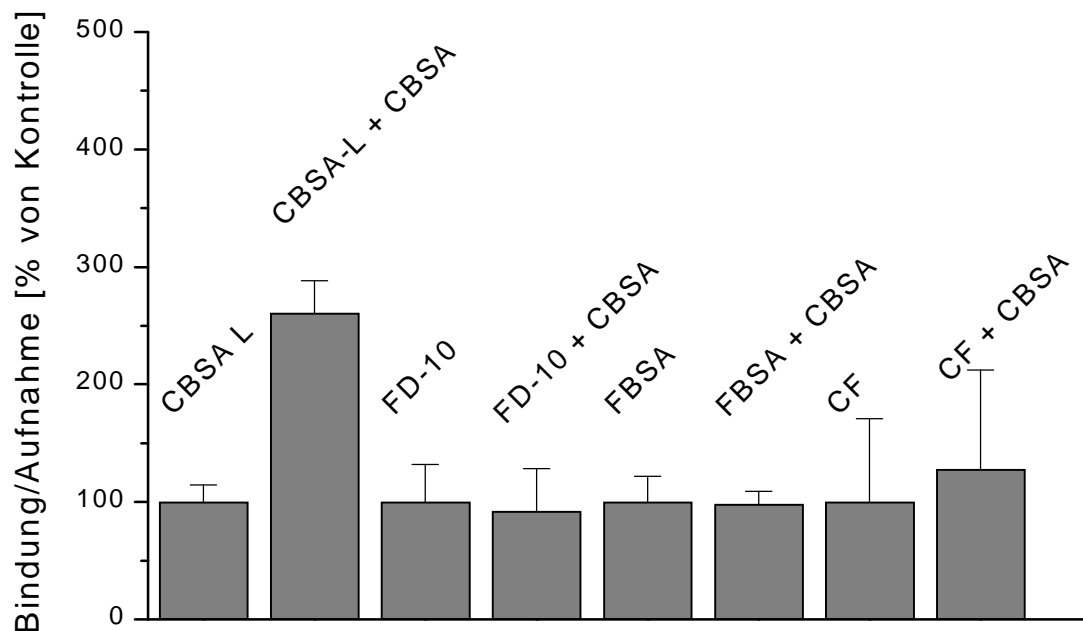


Abbildung 3.55: Beeinflussung der Aufnahme von CBSA-Liposomen und verschiedenen Pinozytosemarkern durch CBSA (CBSA-L: CBSA-konjugierte Liposomen; Charge 46; 80 nmol/ml; FD-10: FITC-Dextran 10.000 20 µg/ml; FBSA: FITC-BSA 20 µg/ml; CF: 5(6)-Carboxyfluoreszein 1 µg/ml; CBSA: CBSA 5 µg/ml; Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 6; Inkubationszeit 1 h; nach Behandlung mit SP; zur besseren Vergleichbarkeit sind die aufgenommenen Mengen jeweils relativ zum Wert ohne CBSA-Zusatz dargestellt; Einzelwerte siehe Tabelle 5.59)

Der Zusatz von CBSA bewirkt bei keiner der verwendeten Substanzen eine Erhöhung der zellulären Aufnahme. Somit ist unwahrscheinlich, dass CBSA durch eine Interaktion mit den Endothelzellen eine generelle Steigerung von Aufnahmeprozessen bewirkt. Wahrscheinlicher ist eine Verbesserung der Aufnahme von Liposomen durch Adsorption an die Liposomenmembran.

3.3.5.11 Zeta-Potenzial von BSA- und CBSA-gekoppelten Liposomen

Voraussetzung für eine Adsorption des positiv geladenen CBSA an die Liposomen ist eine negative Liposomenladung. Deshalb wurde als repräsentative Größe für die Liposomenladung das Zeta-Potenzial je einer mit CBSA und einer mit BSA konjugierten Liposomencharge ermittelt (Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Zeta-Potenzial von BSA- und CBSA-Liposomen

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils 6 Messungen

Protein	Charge	Zeta-Potenzial (mV)	\pm
BSA	45	- 15,5	1,6
CBSA	46	- 4,9	0,6

Überraschenderweise besitzen beide Liposomentypen, also auch die mit CBSA konjugierten, ein negatives Zeta-Potenzial. Offensichtlich reicht die an die Liposomen gekoppelte Menge an kationisiertem Albumin nicht aus, um eine insgesamt positive Ladung zu bewirken. Dies erklärt auch, warum zusätzlich freies CBSA an die Liposomen adsorbieren kann und damit eine nochmals erhöhte Aufnahme in die Zellen bewirkt. Somit könnte die Aufnahme des Konjugates weiter erhöht werden, indem mehr CBSA an die Liposomenoberfläche gekoppelt wird. Im Hinblick auf *in vivo*-Untersuchungen ist jedoch zu beachten, dass CBSA auch in anderen Organen aufgenommen wird und in hohen Dosen nephrotoxisch ist [16]. Hier kommt es aufgrund der positiven Ladung zu einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung. Somit kann es für die Minimierung von Nebenwirkungen von Vorteil sein, dass das Konjugat insgesamt keine positive Ladung aufweist.

3.3.6 Transport von Liposomen durch BCEC-Monolayer

Die in den Abschnitten 3.3.3 bis 3.3.5 dargestellten Resultate belegen eine Aufnahme von CBSA-konjugierten Liposomen in BCEC-Monolayer, die als *in vitro*-Modell der BHS verwendet wurden. Für einen Arzneistofftransport in das Gehirn ist jedoch ein Transport des liposomal eingeschlossenen Wirkstoffs durch den Zellmonolayer hindurch erforderlich. Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß der Einschluss einer Substanz in CBSA-Liposomen auch eine erhöhte Permeabilität zur Folge hat, wurde der Transport von liposomalem und freiem CF untersucht (Abbildung 3.56, Tabelle 3.17).

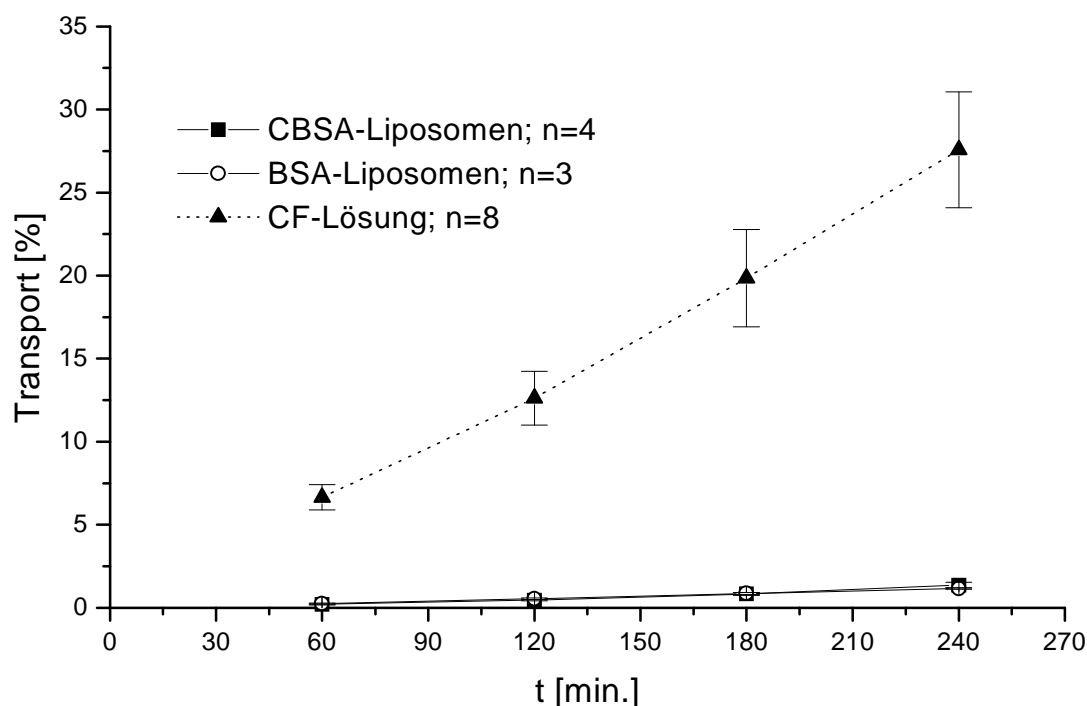


Abbildung 3.56: Transport von liposomalem und freiem CF durch BCEC-Monolayer (CBSA-Liposomen Charge 35; BSA-Liposomen Charge 31; Lipidkonzentration je 200 nmol/ml; CF-Lösung 1 μ M; Einzelwerte siehe Tabelle 5.60 bis Tabelle 5.62)

Tabelle 3.17: apparente Permeabilitätskoeffizienten für den Transport von freiem und liposomalem CF

CF	$P_{app} [cm \times s^{-1}]$
Lösung	$8,3 \times 10^{-6}$
BSA-Liposomen	$3,5 \times 10^{-7}$
CBSA-Liposomen	$3,7 \times 10^{-7}$

Freies CF permeiert ca. $20\times$ besser durch den BCEC-Monolayer als der liposomal eingeschlossene Fluoreszenzfarbstoff. Diese Permeation erfolgt parazellulär durch die im Monolayer vorhandenen Lücken (vgl. 3.1.4). Intakte Liposomen jedoch sind größenbedingt nicht in der Lage, durch diese Lücken hindurch zu diffundieren. Die sehr geringen Permeationsraten und der nur sehr geringe Unterschied der Transportraten von BSA- und CBSA-Liposomen lässt vermuten, dass der Transport von liposomal eingeschlossenem CF nicht auf Aufnahme der Liposomen und anschließender Exozytose des Farbstoffs beruht. Vielmehr ist eine parazelluläre Diffusion von im apikalen Kompartiment aus den Liposomen freigesetztem CF wahrscheinlich.

Dass dennoch eine Interaktion der Liposomen mit dem Zellmonolayer erfolgt, wird bei Betrachtung der Summe der in apikalen und basolateralen Kompartimenten bestimmten Fluoreszenzintensitäten über den Versuchszeitraum deutlich (Abbildung 3.57).

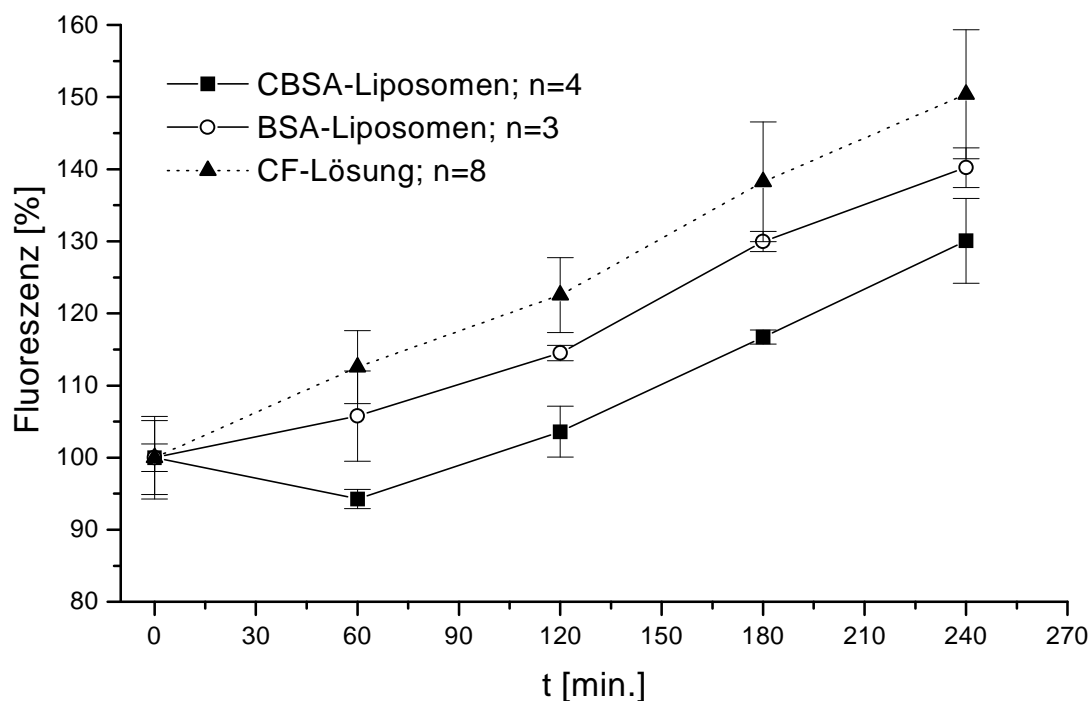


Abbildung 3.57: Zunahme der Fluoreszenzintensität (Einzelwerte siehe Tabelle 5.63 bis Tabelle 5.65)

Insgesamt steigen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten über den gesamten Versuchszeitraum an. Ab den nach einer Stunde bestimmten Werten findet sich für alle drei Gruppen eine nahezu lineare Zunahme mit einer vergleichbaren Steigung, die auf die Verdunstung von Wasser aus den Kulturschalen zurückzuführen ist. Der Kurvenverlauf innerhalb der ersten Stunde zeigt dagegen eine deutliche Abnahme der Gesamtfluoreszenz bei den CBSA-konjugierten Liposomen. Diese Abnahme repräsentiert die an die Zellmembran adsorbierten bzw. in die Zellen aufgenommenen Liposomen.

Liposomal eingeschlossenes CF wird zwar in die Zellen aufgenommen, jedoch nicht wieder freigegeben, so dass insgesamt kein Transport durch Transzytose des Farbstoffs nachzuweisen ist. Die Freigabe des durch Endozytose in die Zellen aufgenommenen liposomal eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs erfordert ein Aufbrechen der Liposomenmembran in Endosomen bzw. Lysosomen. Denkbar ist, dass der durch die hohe Phasenübergangstemperatur des verwendeten DSPCs bedingte Gelzustand der Membran bei 37 °C einen Abbau in diesen Kompartimenten verhindert oder zumindest erschwert. Um den Einfluss der Phasenübergangstemperatur zu untersuchen, wurden die Transportraten von mit BSA und CBSA konjugierten DSPC-Liposomen und DMPC-Liposomen miteinander verglichen (Abbildung 3.58; Tabelle 3.18).

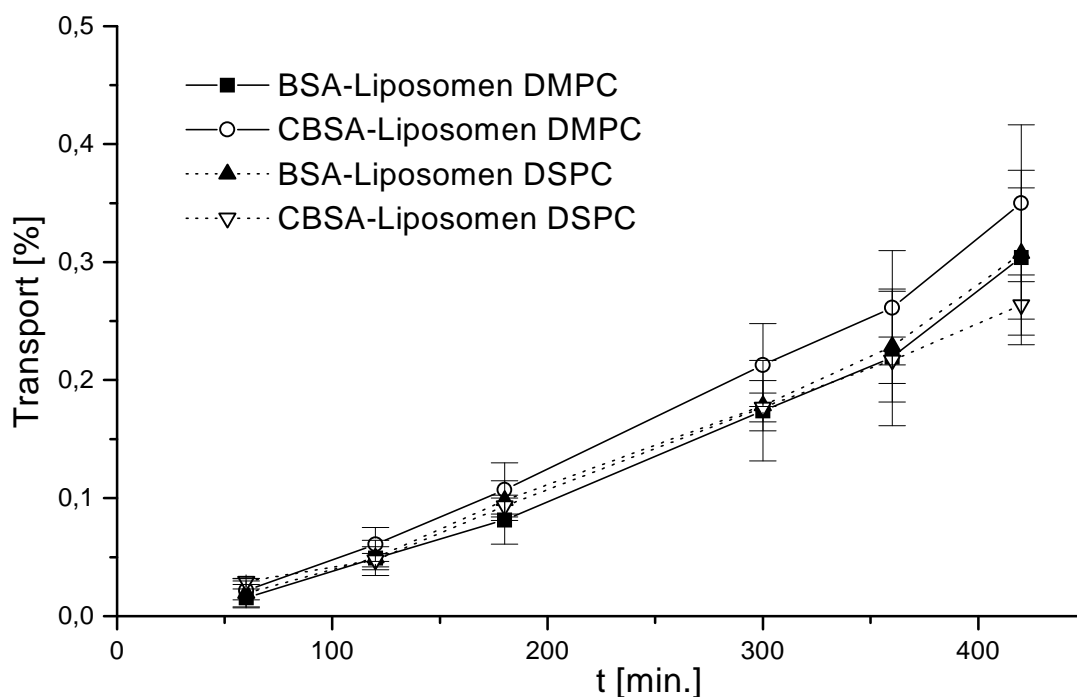


Abbildung 3.58: Abhängigkeit des Transports von liposomalem CF durch BCEC-Monolayer von der Phasenübergangstemperatur der Hauptlipidkomponente (CBSA-Liposomen DSPC Charge 44; BSA-Liposomen DSPC Charge 43; CBSA-Liposomen DMPC Charge 46; BSA-Liposomen DMPC Charge 45; Lipidkonzentration je 400 nmol/ml; Einzelwerte siehe Tabelle 5.66 bis Tabelle 5.69)

Tabelle 3.18: apparente Permeabilitätskoeffizienten für den Transport von liposomalem CF

Liposomales CF	P_{app} [$\text{cm} \times \text{s}^{-1}$]
BSA-DMPC	$5,7 \times 10^{-7}$
CBSA-DMPC	$6,6 \times 10^{-7}$
BSA-DSPC	$5,7 \times 10^{-7}$
CBSA-DSPC	$4,9 \times 10^{-7}$

Die Unterschiede zwischen allen untersuchten Liposomen sind nicht signifikant. Die Verwendung eines Phospholipids mit einer deutlich niedrigeren Phasenübergangstemperatur scheint also keine messbare Erhöhung der Transportrate zu bewirken. Die gemessenen apparenten Permeabilitätskoeffizienten liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie in dem vorherigen Experiment.

Insgesamt kann also mit den zur Verfügung stehenden *in vitro*-Methoden kein Transport einer in CBSA-konjugierten Liposomen eingeschlossenen Substanz durch die BHS nachgewiesen werden. Da es Hinweise darauf gibt, dass die *in vivo* beobachtete Transzytose von CBSA unter *in vitro* Bedingungen verloren geht [154], bedeutet dies nicht, dass es nicht möglich ist, einen verbesserten Transport an der BHS mit liposomalen Konjugaten zu erzielen. Erst durch *in vivo* Untersuchungen mit CBSA-Liposomen bzw. die Verwendung anderer an die Liposomen zu koppelnde Vektoren sollte es möglich sein, diese Frage zu beantworten.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit hatte zum Ziel, ein liposomales Konjugat für ein *drug targeting* des Gehirns zu entwickeln. Schwerpunkte hierbei waren die Etablierung eines Zellkulturmodells der BHS und die Herstellung von liposomalen Konjugaten mit kationisiertem Albumin.

Kapillar-Endothelzellen liessen sich in hoher Ausbeute und Reinheit mit einer enzymatischen Methode aus Schweinehirn isolieren. Die Zellen waren durch Kryokonservierung lagerfähig und konnten in Kulturgefäßen auf verschiedenen Kunststoff- und Glasoberflächen kultiviert werden. Sie wiesen die endothelzellspezifischen Proteine Vimentin und von Willebrand-Faktor auf und besaßen eine hohe Aktivität der γ -Glutamyl-Transferase. Obwohl nur Monolayer moderater Dichte gebildet wurden, war dieses Zellkulturmodell dazu geeignet, Transportprozesse an der BHS funktionell zu untersuchen. Bei der Untersuchung von verschiedenen Ansätzen zur Optimierung der Zelldichte zeigte nur die Verwendung von Astrozyten-konditioniertem Medium einen deutlich positiven Effekt, der allerdings in Relation zum Aufwand für die Gewinnung als zu gering bezeichnet werden muss.

Kationisiertes Albumin wurde aus Serumalbumin hergestellt, sulfhydryliert und an Polyethylenglykol-enthaltende Liposomen gekoppelt. Für die Kopplung war die Stabilität des verwendeten Maleimid-modifizierten Lipids in Verbindung mit der durch die eingesetzten Lipide bedingten hohen Herstellungstemperatur limitierend. Nach Herstellung der Liposomen in saurem Milieu (pH 4,5) gelang eine Proteinkopplung in guten Ausbeuten. Die hergestellten liposomalen Konjugate wiesen eine gute Lagerstabilität auf. Nach 6 Wochen trat bei 4 °C keine Größenänderung auf, die Freigabe von Carboxyfluorescein war ebenso wie die Proteinabsplutung minimal.

Liposomale Konjugate mit kationisiertem Albumin wurden durch Endozytose in die kultivierten Endothelzellen aufgenommen. Mit normalem Serumalbumin konjugierte Kontrollvesikel zeigten dagegen keine Interaktion mit den Zellen. Die Aufnahme war zeit- und konzentrationsabhängig und konnte mit verschiedenen Inhibitoren, darunter Filipin, gehemmt werden. Die Hemmung mit Filipin deutete auf eine Aufnahme der Liposomen in bestimmten Regionen der Zellemembran, den *caveolae*, hin. Ein verbesserter Transport von in diesen Liposomen eingeschlossenem CF **durch** Zellmonolayer hindurch konnte nicht festgestellt werden. Mit diesem Konjugat ist also ein *targeting* der Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke möglich. Ein Wirkstofftransfer in das Hirngewebe selbst muss mit *in vivo*-Experimenten abgeklärt werden.

5 ANHANG

Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität

Tabelle 5.1:

Gruppe	EA [U]	s [U]	s _{rel} [%]	n
Hirnhomogenat	6,9	0,51	7,35	3
Kapillaren	70,9	3,78	5,32	3
normal	20,4	0,18	0,89	3
normal + cAMP	25,4	0,14	0,55	3
ACM	19,7	0,38	1,95	3
ACM + cAMP	22,6	0,37	1,65	3
SFM	16,4	0,31	1,91	3
SFM + cAMP	21,6	0,09	0,41	3

Transport von CF durch Transwell®-Snapwell®-Filtereinsätze in der Costar-Apparatur

Tabelle 5.2: nur Filter

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
30	4,2	0,58	13,8	6
60	8,0	0,78	9,8	6
90	11,3	0,68	6,0	6
120	15,1	0,94	6,2	6
150	18,1	1,05	5,8	6
180	21,7	0,98	4,5	6

Tabelle 5.3 BCEC-Monolayer

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
30	1,4	0,14	9,7	6
60	3,3	0,20	6,1	6
90	5,6	0,29	5,2	6
120	8,1	0,35	4,3	6
150	10,7	0,82	7,6	6
180	14,4	0,64	4,4	6

Transport von CF durch Transwell®-clear-Filtereinsätze

Tabelle 5.4: Filter

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
10	10,0	0,55	5,5	6
20	20,8	0,39	1,9	6
30	30,8	0,82	2,7	6
40	40,3	0,89	2,2	6
50	49,3	1,51	3,1	6
60	58,5	1,71	2,9	6

Tabelle 5.5: BCEC-Monolayer

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
15	2,0	0,10	4,9	6
30	4,5	0,39	8,6	6
45	7,1	0,51	7,1	6
60	9,7	0,68	7,1	6
75	12,0	0,95	7,9	6
90	14,2	1,19	8,4	6

Transport von CF und FITC-Dextranen durch BCEC-Monolayer in Transwell®-clear-Filtereinsätzen

Tabelle 5.6: CF

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	3,0	0,53	17,4	4
30	5,6	0,91	16,2	4
45	8,1	1,47	18,1	4
60	10,4	1,98	19,0	4
75	12,8	2,52	19,7	4
90	15,3	3,08	20,1	4

Tabelle 5.7: FD-4

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,12	10,2	4
30	2,6	0,23	8,9	4
45	4,0	0,34	8,6	4
60	5,4	0,44	8,2	4
75	6,8	0,57	8,3	4
90	8,3	0,69	8,3	4

Tabelle 5.8: FD-10

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,6	0,06	9,3	4
30	1,4	0,16	11,5	4
45	2,1	0,24	11,6	4
60	2,9	0,36	12,4	4
75	3,6	0,46	12,7	4
90	4,4	0,57	12,9	4

Tabelle 5.9: FD-20

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,6	0,14	25,1	4
30	0,8	0,21	25,3	4
45	1,1	0,29	26,4	4
60	1,4	0,38	26,7	4
75	1,8	0,48	27,2	4
90	2,1	0,57	26,8	4

Tabelle 5.10: FD-40

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,3	0,02	6,5	4
30	0,5	0,04	8,0	4
45	0,8	0,08	10,5	4
60	1,1	0,13	12,3	4
75	1,3	0,16	12,3	4
90	1,6	0,25	15,0	4

Tabelle 5.11: FD-70

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,2	0,03	14,0	4
30	0,4	0,04	8,8	4
45	0,6	0,05	8,8	4
60	0,8	0,07	8,8	4
75	1,0	0,09	8,9	4
90	1,2	0,11	8,9	4

Transport von CF durch BCEC-Monolayer unter verschiedenen Kulturbedingungen

Tabelle 5.12: S+;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	3,2	0,55	17,0	4
30	6,9	1,02	14,8	4
45	11,0	1,53	14,0	4
60	15,2	2,04	13,4	4
75	19,4	2,43	12,5	4
90	23,9	2,99	12,5	4

Tabelle 5.13: S+;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	3,7	0,59	16,2	4
30	8,0	1,00	12,5	4
45	12,5	1,30	10,4	4
60	17,0	1,57	9,2	4
75	21,4	1,72	8,1	4
90	26,2	1,87	7,1	4

Tabelle 5.14: S-;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	4,5	0,28	6,1	4
30	8,4	0,40	4,8	4
45	12,4	0,57	4,6	4
60	16,8	0,75	4,4	4
75	21,3	0,86	4,0	4
90	25,6	0,94	3,7	4

Tabelle 5.15: S-;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	7,4	0,34	4,6	4
30	13,5	0,65	4,8	4
45	19,5	0,91	4,7	4
60	25,5	1,07	4,2	4
75	30,9	1,30	4,2	4
90	36,3	1,45	4,0	4

Transport von FD-4 durch BCEC-Monolayer unter verschiedenen Kulturbedingungen

Tabelle 5.16: S+;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,16	12,7	4
30	2,2	0,29	13,5	4
45	3,2	0,42	13,0	4
60	4,4	0,52	11,9	4
75	5,6	0,58	10,3	4
90	7,1	0,69	9,7	4

Tabelle 5.18: S+;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,9	0,26	30,1	4
30	1,7	0,43	25,9	4
45	2,5	0,57	23,1	4
60	3,4	0,68	19,9	4
75	4,5	0,78	17,5	4
90	5,6	0,94	16,6	4

Tabelle 5.17: S-;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,06	5,0	4
30	2,2	0,11	5,1	4
45	3,4	0,16	4,7	4
60	4,9	0,23	4,8	4
75	6,3	0,27	4,3	4
90	8,0	0,35	4,3	4

Tabelle 5.19: S-;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	2,3	0,12	5,5	4
30	4,2	0,19	4,6	4
45	6,2	0,28	4,5	4
60	8,5	0,35	4,1	4
75	10,7	0,44	4,1	4
90	13,0	0,50	3,8	4

Transport von FD-10 durch BCEC-Monolayer unter verschiedenen Kulturbedingungen

Tabelle 5.20: S+;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,8	0,13	17,5	4
30	1,2	0,22	18,8	4
45	1,7	0,27	16,3	4
60	2,3	0,35	15,4	4
75	2,9	0,46	16,0	4
90	3,7	0,57	15,4	4

Tabelle 5.21: S-;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,6	0,04	6,0	4
30	1,3	0,08	5,9	4
45	2,0	0,11	5,4	4
60	3,0	0,16	5,4	4
75	3,9	0,19	5,0	4
90	5,1	0,23	4,5	4

Tabelle 5.22: S+;HC+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,6	0,03	5,8	4
30	0,9	0,04	4,3	4
45	1,3	0,08	5,7	4
60	1,8	0,11	6,3	4
75	2,3	0,17	7,1	4
90	3,0	0,23	7,6	4

Tabelle 5.23: S-;HC-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,19	15,8	4
30	2,4	0,24	10,0	4
45	3,6	0,26	7,2	4
60	5,1	0,30	5,9	4
75	6,6	0,30	4,6	4
90	8,3	0,31	3,7	4

Transport von CF, FD-4 und FD-10 durch BCEC-Monolayer, Zellen normal kultiviert bzw. passagiert

Tabelle 5.24: CF, normal

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	2,6	0,53	20,6	4
30	5,1	1,06	20,7	4
45	7,6	1,61	21,1	4
60	10,1	2,23	22,2	4
75	12,4	2,79	22,5	4
90	14,5	3,31	22,8	4

Tabelle 5.27: FD-4, passagiert

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,1	0,15	13,3	4
30	1,7	0,23	13,8	4
45	2,2	0,34	15,4	4
60	2,7	0,43	16,1	4
75	3,1	0,52	16,8	4
90	3,5	0,61	17,3	4

Tabelle 5.25: CF, passagiert

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	2,4	0,34	14,2	4
30	4,7	0,67	14,2	4
45	7,0	0,98	14,0	4
60	9,3	1,27	13,6	4
75	11,3	1,49	13,2	4
90	13,3	1,76	13,2	4

Tabelle 5.28: FD-10, normal

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,6	0,02	2,7	4
30	0,8	0,05	6,0	4
45	1,0	0,06	5,9	4
60	1,1	0,06	5,4	4
75	1,3	0,11	8,0	4
90	1,5	0,14	9,2	4

Tabelle 5.26: FD-4, normal

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,10	8,2	4
30	1,7	0,15	8,9	4
45	2,3	0,42	18,1	4
60	2,8	0,47	16,9	4
75	3,3	0,55	16,8	4
90	3,7	0,61	16,2	4

Tabelle 5.29: FD-10, passagiert

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	0,5	0,07	14,3	4
30	0,6	0,09	13,1	4
45	0,8	0,10	12,3	4
60	1,0	0,13	12,3	4
75	1,2	0,15	12,3	4
90	1,4	0,17	11,9	4

*Einfluss von ACM und cAMP auf den Transport von FD-4 durch BCEC-Monolayer***Tabelle 5.30:** EM, cAMP-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,5	0,65	43,3	6
30	3,0	0,90	29,7	6
45	4,5	1,12	24,8	6
60	6,0	1,31	21,6	6
75	7,6	1,48	19,4	6
90	9,1	1,71	18,7	6

Tabelle 5.31: EM, cAMP+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,3	0,27	21,1	6
30	2,9	0,57	19,6	6
45	4,5	0,92	20,4	6
60	6,5	1,33	20,6	6
75	8,4	1,68	20,1	6
90	10,2	2,01	19,7	6

Tabelle 5.32: ACM, cAMP-

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,0	0,14	13,6	6
30	2,2	0,26	11,7	6
45	3,4	0,39	11,3	6
60	4,7	0,51	10,9	6
75	5,9	0,63	10,7	6
90	7,2	0,70	9,7	6

Tabelle 5.33: ACM, cAMP+

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	N
15	1,3	0,36	27,5	6
30	3,0	0,87	29,1	6
45	4,7	1,42	30,2	6
60	6,5	1,96	30,4	6
75	8,3	2,50	30,2	6
90	10,2	3,09	30,3	6

*Transport von CF und Rh123 durch BCEC-Monolayer in Transwell®-clear-Filtereinsätzen***Tabelle 5.34:** CF

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,1	0,14	12,8	4
30	2,3	0,31	13,9	4
45	3,4	0,54	15,7	4
60	4,7	0,80	16,9	4
75	5,9	1,08	18,2	4
90	7,0	1,35	19,2	4

Tabelle 5.35: Rh123 mit Verapamil

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,17	13,4	4
30	3,4	0,37	10,8	4
45	6,1	0,61	10,0	4
60	8,5	0,82	9,7	4
75	10,5	1,09	10,4	4
90	12,2	1,34	11,0	4

Tabelle 5.36: Rh123 ohne Verapamil

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,3	0,16	12,1	4
30	3,4	0,27	7,9	4
45	5,2	0,36	6,9	4
60	6,9	0,43	6,2	4
75	8,6	0,46	5,4	4
90	10,2	0,56	5,5	4

Transport von FD-4 durch BCEC-Monolayer in Transwell®-clear-Filtereinsätzen

Tabelle 5.37: FD-4 ohne DMSO

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,1	0,08	7,9	4
30	2,4	0,23	9,5	4
45	3,6	0,33	9,2	4
60	4,9	0,48	9,8	4
75	6,3	0,67	10,7	4
90	7,7	0,90	11,7	4

Tabelle 5.39: FD-4 2% DMSO

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,3	0,24	18,7	4
30	3,0	0,45	15,0	4
45	4,6	0,73	15,9	4
60	6,2	1,08	17,5	4
75	7,7	1,37	17,7	4
90	9,4	1,67	17,7	4

Tabelle 5.38: FD-4 1% DMSO

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
15	1,2	0,15	11,8	4
30	2,7	0,24	8,8	4
45	4,3	0,36	8,4	4
60	5,8	0,48	8,2	4
75	7,3	0,67	9,2	4
90	8,9	0,92	10,4	4

Transport von CF, Salicylsäure und Salicylsäure-Glucosid durch BCEC-Monolayer in der Costar-Apparatur

Tabelle 5.40: Salicylsäure

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
30	3,5	0,36	10,4	6
60	7,4	1,00	13,6	6
90	10,9	0,43	4,0	6
120	15,5	0,96	6,2	6

Tabelle 5.42: CF

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
30	1,5	0,15	10,2	6
60	3,4	0,26	7,6	6
90	5,5	0,52	9,3	6
120	7,9	0,75	9,4	6

Tabelle 5.41: Salicylsäure-Glucosid

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
30	2,2	0,24	10,8	6
60	4,6	0,60	12,9	6
90	7,8	0,80	10,3	6
120	11,4	1,23	10,8	6

Aufnahme von FITC-BSA und FITC-CBSA in BCEC-Monolayer

Tabelle 5.43: FITC-BSA; 4 °C

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,016	4,9	3,30	67,0	6
0,032	12,3	2,77	22,5	6
0,064	32,5	9,92	30,5	6
0,128	58,4	6,61	11,3	6
0,255	101,2	8,93	8,8	6
0,510	163,7	51,75	31,6	6

Tabelle 5.44: FITC-BSA; 37 °C

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,016	1,5	0,46	31,7	6
0,032	14,8	5,12	34,7	6
0,064	22,5	9,27	41,3	6
0,128	60,2	13,39	22,3	6
0,255	90,8	13,12	14,4	6
0,510	135,4	18,91	14,0	6

Tabelle 5.45: FITC-CBSA; 4 °C

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,017	92,7	5,73	6,2	6
0,034	146,4	19,16	13,1	6
0,069	209,1	44,93	21,5	6
0,138	276,8	43,66	15,8	6
0,275	394,6	88,76	22,5	6
0,550	526,8	69,66	13,2	6

Tabelle 5.46: FITC-CBSA; 37 °C

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,017	174,7	9,00	5,2	6
0,034	302,1	49,73	16,5	6
0,069	342,5	109,07	31,8	6
0,138	541,7	63,25	11,7	6
0,275	711,7	121,52	17,1	6
0,550	893,9	76,20	8,5	6

*Adsorption von BSA und CBSA an Mikrotiterplatten***Tabelle 5.47:** BSA

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,015	16,6	4,77	28,7	12
0,029	14,6	6,00	41,1	12
0,059	16,1	6,32	39,2	12
0,118	21,2	5,74	27,1	12
0,235	23,4	4,19	17,9	12
0,470	28,6	5,79	20,3	12

Tabelle 5.48: CBSA

c [mg/ml]	Uptake [ng]	s	s _{rel}	n
0,018	59,0	8,21	13,9	12
0,037	61,5	10,41	16,9	12
0,074	64,3	13,83	21,5	12
0,148	66,3	12,35	18,6	12
0,295	73,0	10,77	14,7	12
0,590	79,8	8,47	10,6	12

*Zeitabhängigkeit der Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; ohne bzw. mit acid wash***Tabelle 5.49:** ohne acid wash

t [min.]	Uptake [nmol]	s	s _{rel}	n
30	0,159	0,035	22,3	6
60	0,245	0,060	24,6	6
90	0,265	0,033	12,4	6
120	0,268	0,048	18,0	6

Tabelle 5.50: mit acid wash

t [min.]	Uptake [nmol]	s	s _{rel}	n
60	0,195	0,039	20,0	6
120	0,312	0,030	9,7	6

Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; Abhängigkeit von der Vesikelgröße

Tabelle 5.51:

Größe [nm]	Uptake [%]	s	s_{rel}	n
122	100,0	8,4	8,4	10
164	105,1	11,4	10,9	10
204	97,1	19,7	20,3	10

Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; Einfluss von Inhibitoren

Tabelle 5.52:

Gruppe	Uptake [%]	s	s_{rel}	n
Liposomen	100,0	16,6	16,6	10
10 CBSA	55,5	6,7	12,0	10
100 CBSA	9,7	1,8	18,8	10
PheAsO	25,8	7,09	27,4	10
Noco	50,5	19,45	38,5	10
Filipin	57,7	8,50	14,7	10
DC	105,4	10,42	9,9	10

Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; Abhängigkeit von der Liposomenkonzentration

Tabelle 5.53:

c [nmol/ml]	Uptake [nmol]	s	s_{rel}	n
4	0,004	0,002	46,7	10
10	0,006	0,001	24,1	10
20	0,011	0,002	18,0	10
30	0,017	0,003	17,8	10
40	0,026	0,002	8,6	10
100	0,221	0,090	40,5	10
200	1,498	0,163	10,9	10
300	2,715	0,426	15,7	10
400	4,096	0,235	5,7	10

Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; Abhängigkeit von PGP-/MRP-Substraten und CBSA

Tabelle 5.54:

Gruppe	Uptake [nmol]	s	s_{rel}	n
Kontrolle	0,126	0,023	17,9	10
CBSA	1,146	0,159	13,9	10
LTC4	0,112	0,027	24,1	10
CyA	0,078	0,005	6,2	10
Vera	0,103	0,019	18,3	10

Aufnahme von CBSA-Liposomen in BCEC-Monolayer; Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Tabelle 5.55: normal

c [nmol/ml]	Uptake [nmol]	s	s_{rel}	n
20	0,018	0,003	15,5	6
30	0,029	0,003	10,5	6
40	0,036	0,005	13,2	6

Tabelle 5.56: 1 % BSA

c [nmol/ml]	Uptake [nmol]	s	s_{rel}	n
20	0,013	0,002	14,2	6
30	0,020	0,002	9,1	6
40	0,025	0,001	2,3	6

Tabelle 5.57: 1 % BSA + 5 µg/ml CBSA

c [nmol/ml]	Uptake [nmol]	s	s_{rel}	n
20	0,201	0,032	15,9	6
30	0,298	0,041	13,7	6
40	0,445	0,139	31,2	6

Einfluss von CBSA auf die Aufnahme von verschiedenen Liposomentypen und Pinozytosemarkern

Tabelle 5.58: Liposomentypen

Gruppe	Uptake [nmol]	s	s _{rel}	n
CBSA-L	0,286	0,041	14,5	6
CBSA-L + CBSA	0,746	0,079	10,5	6
BSA-L	0,040	0,006	15,4	6
BSA-L + CBSA	0,520	0,041	7,9	6
PEG-L	0,011	0,001	13,2	6
PEG-L + CBSA	0,062	0,009	14,2	6
L	0,011	0,002	17,3	6
L + CBSA	0,146	0,023	15,7	6

Tabelle 5.59: Pinozytosemarker

Gruppe	Uptake [%]	s	s _{rel}	n
CBSA L 100		14,5	14,5	6
CBSA- 260 L + CBSA		27,5	10,5	6
FD-10 100		31,9	31,9	6
FD-10 + 92 CBSA		36,3	39,4	6
FBSA 100		21,8	21,8	6
FBSA + 98 CBSA		10,8	11,0	6
CF 100		71,1	71,1	6
CF + 128 CBSA		84,4	66,0	6

Transport von liposomalem und freiem CF durch BCEC-Monolayer

Tabelle 5.60: CBSA-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
60	0,20	0,03	15,6	4
120	0,46	0,04	9,6	4
180	0,83	0,09	10,5	4
240	1,35	0,17	12,6	4

Tabelle 5.62: CF

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
60	6,65	0,76	11,4	8
120	12,62	1,63	12,9	8
180	19,84	2,93	14,8	8
240	27,57	3,48	12,6	8

Tabelle 5.61: BSA-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s _{rel}	n
60	0,25	0,02	7,3	3
120	0,54	0,04	8,3	3
180	0,85	0,06	7,0	3
240	1,15	0,05	4,1	3

*Transport von liposomalem und freiem CF durch BCEC-Monolayer; Fluoreszenzzunahme***Tabelle 5.63:** CBSA-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
0	100,00	5,72	5,7	4
60	94,26	1,34	1,4	4
120	103,60	3,53	3,4	4
180	116,72	0,97	0,8	4
240	130,08	5,89	4,5	4

Tabelle 5.65: CF

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
0	100,00	5,12	5,1	8
60	112,55	5,08	4,5	8
120	122,56	5,19	4,2	8
180	138,25	8,27	6,0	8
240	150,39	8,94	5,9	8

Tabelle 5.64: BSA-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
0	100,00	1,90	1,9	3
60	105,77	6,26	5,9	3
120	114,51	1,07	0,9	3
180	129,98	1,40	1,1	3
240	140,22	2,75	2,0	3

*Transport von Liposomen durch BCEC-Monolayer; Abhängigkeit vom Lipidtyp***Tabelle 5.66:** BSA-DMPC-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
60	0,015	0,008	49,5	6
120	0,049	0,010	20,1	6
180	0,082	0,021	25,4	6
300	0,174	0,043	24,5	6
360	0,219	0,058	26,4	6
420	0,304	0,074	24,3	6

Tabelle 5.68: BSA-DSPC-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
60	0,019	0,012	63,6	6
120	0,049	0,015	30,2	6
180	0,098	0,017	17,2	6
300	0,178	0,021	12,0	6
360	0,228	0,047	20,6	6
420	0,307	0,056	18,1	6

Tabelle 5.67: CBSA-DMPC-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
60	0,022	0,008	36,6	6
120	0,061	0,015	23,9	6
180	0,107	0,023	21,5	6
300	0,213	0,035	16,4	6
360	0,261	0,049	18,6	6
420	0,350	0,066	19,0	6

Tabelle 5.69: CBSA-DSPC-Liposomen

t [min.]	Transport [%]	s	s_{rel}	n
60	0,029	0,003	8,6	6
120	0,047	0,006	12,1	6
180	0,093	0,007	7,2	6
300	0,177	0,012	6,8	6
360	0,217	0,020	9,1	6
420	0,264	0,025	9,6	6

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Z. Albert, M. Orlowski, Z. Ruzcidlo und J. Orlowski:** Studies on γ -glutamyl-transpeptidase activity and its histochemical localization in the central nervous system in man and different animal species. In: *Acta Histochemica* 25 (1966), S. 312-320
- [2] **B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J.D. Watson:** *Molekularbiologie der Zelle* 3. Aufl. Weinheim: VCH, 1995
- [3] **T.M. Allen, A.K. Ahmad, I. Agrawal, C.B. Hansen und S. Zalipsky:** Antibody-mediated targeting of long-circulating (Stealth[®]) liposomes. In: *Journal of Liposome Research* 4 (1994), Nr. 1, S. 1-25
- [4] **T.M. Allen, E. Brandeis, C.B. Hansen, G.Y. Kao und S. Zalipsky:** A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1237 (1995), Nr. 2, S. 99-108
- [5] **T.M. Allen, C.B. Hansen und D.E. Lopez De Menezes:** Pharmacokinetics of long circulating liposomes. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995), S. 267-284
- [6] **R.N. Alyautdin, V.E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D.A. Kharkevich und J. Kreuter:** Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. In: *Pharmaceutical Research* 14 (1997), Nr. 3, S. 325-328
- [7] **R.N. Alyautdin, E.B. Tezikov, P. Ramge, D.A. Kharkevich, D.J. Begley und J. Kreuter:** Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. In: *Journal of Microencapsulation* 15 (1998), Nr. 1, S. 67-74
- [8] **R.G.W. Anderson:** The caveolae membrane system. In: *Annual Reviews Biochemistry* 67 (1998), S. 199-225
- [9] **R.G.W. Anderson, B.A. Kamen, K.G. Rothberg und S.W. Lacey:** Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. In: *Science* 255 (1992), S. 410-411
- [10] **B.K. Armstrong, Q. Smith, S.I. Rapoport, J. Strohalm, J. Kopecek und R. Duncan:** Osmotic opening of the blood-brain barrier permeability to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. Effect of polymer M_w , charge and hydrophobicity. In: *Journal of Controlled Release* 10 (1989), S. 27-35
- [11] **K.L. Audus und R.T. Borchardt:** Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. In: *Pharmaceutical Research* 3 (1986), Nr. 2, S. 81-87
- [12] **K.L. Audus und R.T. Borchardt:** Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier. In: *Annals New York Academy of Sciences* 507 (1987), S. 9-18
- [13] **M.S. Balda, M.B. Fallon, C.M. Van Itallie und J.M. Anderson:** Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in the gastrointestinal tract. In: *Yale Journal of Biological Medicine* 65 (1992), S. 725-735
- [14] **A.L. Baldwin und S. Chien:** Endothelial transport of anionized and cationized ferritin in the rabbit thoracic aorta and vasa vasorum. In: *Arteriosclerosis* 4 (1984), S. 372-382
- [15] **A.D. Bangham, M.M. Standish und J.C. Watkins:** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. In: *Journal of Molecular Biology* 13 (1965), S. 238-252
- [16] **P.S. Bass, A.F. Drake, Y. Wang, J.H. Thomas und D.R. Davies:** Cationization of bovine serum albumin alters its conformation as well as its charge. In: *Laboratory Investigation* 62 (1990), Nr. 2, S. 185-188
- [17] **E.A. Bayer, B. Rivnay und E. Skutelsky:** On the mode of liposome-cell interactions. Biotin-conjugated lipids as ultrastructural probes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 550 (1979), S. 464-473
- [18] **D. J. Begley:** The blood-brain-barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48 (1996), S. 136-146

- [19] **G. Bendas, A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel und U. Rothe:** Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. In: *International Journal of Pharmaceutics* 181 (1999), S. 79-93
- [20] **J. Berberich:** *Quantitative Bestimmung der Wechselwirkung von Zellen und Liposomen mit Hilfe fluorimetrischer Methoden* Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1990
- [21] **U. Bickel, T. Yoshikawa, E.M. Landaw, K.F. Faull und W.M. Pardridge:** Pharmacologic effects in vivo in brain by vector-mediated peptide drug delivery. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90 (1993), Nr. 4, S. 2618-2622
- [22] **D. Biegel, D.D. Spencer und J.S. Pachter:** Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. In: *Brain Research* 692 (1995), S. 183-189
- [23] **N. Bodor, L. Prokai, W.-W. Wu, H. Farag, S. Jonalagadda, M. Kawamura und J. Simpkins:** A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism. In: *Science* 257 (1992), S. 1698-1700
- [24] **G. Borchard, K.L. Audus, F. Shi und J. Kreuter:** Uptake of surfactant-coated poly-(methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 110 (1994), S. 29-35
- [25] **P.D. Bowman, A.L. Betz, D. Ar, J.S. Wolinsky, J.B. Penney, R.R. Shivers und G.W. Goldstein:** Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In: *In Vitro* 17 (1981), Nr. 4, S. 353-362
- [26] **M. Bradford:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248-254
- [27] **K. Brendel, E. Meezan und E.C. Carlson:** Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. In: *Science* 185 (1974), S. 953-955
- [28] **M.E. Brewster, K. Raghavan, E. Pop und N. Bodor:** Enhanced delivery of ganciclovir to the brain through the use of redox targeting. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (1994), Nr. 4, S. 817-823
- [29] **M.E. Brewster, W.R. Anderson, D.O. Helton, N. Bodor und E. Pop:** Dose-dependent brain delivery of zidovudine through the use of a zidovudine chemical delivery system. In: *Pharmaceutical Research* 12 (1995), Nr. 5, S. 796-798
- [30] **R.D. Broadwell, B.J. Baker-Cairns, P.M. Friden, C. Oliver und J.C. Villegas:** Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium III. receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. In: *Experimental Neurology* 142 (1996), S. 47-65
- [31] **V. Carelli, F. Liberatore, L. Scipione, M. Impicciatore, E. Barocelli, M. Cardellini und G. Giorgioni:** New systems for the specific delivery and sustained release of dopamine to the brain. In: *Journal of Controlled Release* 42 (1996), S. 209-216
- [32] **J. Carlsson, H. Drevin und R. Axen:** Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. In: *Biochemical Journal* 173 (1978), Nr. 3, S. 723-737
- [33] **M.L. Caspers und C.A. Diglio:** Expression of γ -glutamyltranspeptidase in a transformed rat cerebral endothelial cell line. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 803 (1984), S. 1-6
- [34] **E.M. Cornford und W.H. Oldendorf:** Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 25 (1975), S. 825-829
- [35] **E.M. Cornford, L.D. Braun und W.H. Oldendorf:** Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogues. In: *Journal of Neurochemistry* 30 (1978), S. 299-308
- [36] **K. Cremer:** *Entwicklung und Charakterisierung von TNF-Liposomen für die intratumorale Therapie* Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1993
- [37] **C. Crone und S.P. Olesen:** Electrical resistance of brain microvascular endothelium. In: *Brain Research* 241 (1982), S. 49-55

- [38] **P.J.A. Davies, D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham und I.H. Pastan:** Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of α_2 -macroglobulin and polypeptide hormones. In: *Nature* 283 (1980), S. 162-167
- [39] **H. Davson:** History of the blood-brain barrier concept. In: Neuwelt, E.A.: Implications of the blood-brain barrier and its manipulation. Bd. 1. New York: Plenum, 1989, S. 27-52
- [40] **L.E. DeBault, L.E. Kahn, S.P. Frommes und P.A. Cancilla:** Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. In: *In Vitro* 15 (1979), S. 473-487
- [41] **R.J. Debs, T.D. Heath und D. Papahadjopoulos:** Targeting of anti-Thy 1.1 monoclonal antibody conjugated liposomes in Thy 1.1 mice after intravenous administration. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1233 (1987), S. 183-190
- [42] **Y. Deguchi, K. Inabe, K. Tomiyasu, K. Nozawa, S. Yamada und R. Kimura:** Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. In: *Pharmaceutical Research* 12 (1995), Nr. 12, S. 1838-1844
- [43] **B. Dehouck, L. Fenart, M.-P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier und R. Cecchelli:** A new function for the LDL-receptor: transcytosis of LDL at the blood-brain barrier. In: *The Journal of Cell Biology* 138 (1997), Nr. 8, S. 877-889
- [44] **M.P. Dehouck, S. Meresse, B. Dehouck, J. C. Fruchart und R. Cecchelli:** In vitro reconstituted blood-brain barrier. In: *Journal of Controlled Release* 21 (1992), S. 81-92
- [45] **R. Dermietzel und D. Krause:** Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. In: *International Reviews of Cytology* 127 (1991), S. 57-109
- [46] **A. Dinter und E.G. Berger:** Golgi-disturbing agents. In: *Histochemical Cell Biology* 109 (1998), S. 571-590
- [47] **N. Drion, M. Lemaire, J.-M. Lefauconnier und J.-M. Scherrmann:** Role of p-glycoprotein in the blood-brain barrier transport of colchicine and vinblastine. In: *Journal of Neurochemistry* 67 (1996), Nr. 4, S. 1688-1693
- [48] **R. Duncan, M.K. Pratten und J.B. Lloyd:** Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 587 (1979), S. 463-475
- [49] **R.J.S. Duncan, P.D. Weston und R. Wrigglesworth:** A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. In: *Analytical Biochemistry* 132 (1983), S. 68-73
- [50] **J.K. Dunnick, I.R. McDougall, S. Aragon, M.L. Goris und J.P. Kriss:** Vesicle interactions with polyamino acids and antibodies: in vitro and in vivo studies. In: *Journal of Nuclear Medicine* 16 (1975), S. 483-487
- [51] **S. Duport, F. Robert, D. Muller, G. Grau, L. Parisi und L. Stoppini:** An in vitro blood-brain barrier model: Cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95 (1998), S. 1840-1845
- [52] **P. Ehrlich:** *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie* Berlin: Hirschwald, 1885
- [53] **B. El Hafny, J.-M. Bourre und F. Roux:** Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. In: *Journal of Cellular Physiology* 167 (1996), S. 451-460
- [54] **G.L. Ellman:** Tissue sulfhydryl groups. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82 (1959), Nr. 82, S. 70-77
- [55] **A. Frey, B. Meckelein, B. Weiler, R. Möckel, R. Flach und H.G. Gassen:** Pericytes of the brain microvasculature express γ -glutamyl transpeptidase. In: *European Journal of Biochemistry* 202 (1991), S. 421-429
- [56] **P. M. Friden:** Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier. In: *Journal of Controlled Release* 46 (1996), S. 117-128
- [57] **P.M. Friden:** Receptor-mediated transport of therapeutics across the blood-brain barrier. In: *Neurosurgery* 35 (1994), Nr. 2, S. 294-298

- [58] **P.M. Friden, L.R. Walus, G.F. Musso, M.A. Taylor, B. Malfry und R.M. Starzyk:** Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88 (1991), Nr. 6, S. 4771-4775
- [59] **B. Frisch, C. Boeckler und F. Schuber:** Synthesis of short polyoxyethylene-based heterobifunctional cross-linking reagents. Application to the coupling of peptides to liposomes. In: *Bioconjugate Chemistry* 7 (1996), S. 180-186
- [60] **M. Fukuta, H. Okada, S. Iinuma, S. Yanai und H. Toguchi:** Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier. In: *Pharmaceutical Research* 11 (1994), Nr. 12, S. 1681-1688
- [61] **A. Gabizon, R. Shiota und D. Papahadjopoulos:** Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. In: *Journal of the National Cancer Institute* 81 (1989), S. 1484-1488
- [62] **A. Gabizon, A.T. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, F. Mandelbaum-Shavit, M.M. Qazen und S. Zalipsky:** Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. In: *Bioconjugate Chemistry* 10 (1999), S. 289-298
- [63] **M. Gekle, S. Mildenerberger, R. Freudinger, G. Schwerdt und S. Silbernagl:** Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. In: *American Journal of Physiology* 272 (1997), S. F668-F677
- [64] **N. Ghinea und N. Simionescu:** Anionized and cationized undecapeptides as probes for cell surface charge and permeability studies: differentiated labeling of endothelial plasmalemmal vesicles. In: *Journal of Cell Biology* 100 (1985), S. 606-612
- [65] **P.L. Golden, T.J. Maccagnan und W.M. Pardridge:** Human blood-brain barrier leptin receptor. In: *Journal of Clinical Investigation* 99 (1997), Nr. 1, S. 14-18
- [66] **G.W. Goldstein, J.S. Wolinsky, J. Csejtey und I. Diamond:** Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. In: *Journal of Neurochemistry* 25 (1975), S. 715-717
- [67] **G.M. Grass und S.A. Sweetana:** In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. In: *Pharmaceutical Research* 5 (1988), Nr. 6, S. 372-376
- [68] **D.E. Griffin und J. Giffels:** Study of protein characteristics that influence entry into the cerebrospinal fluid of normal mice with encephalitis. In: *Journal of Clinical Investigation* 70 (1982), Nr. 8, S. 289-295
- [69] **M.K. Gumerlock und E.A. Neuwalt:** Therapeutic opening of the blood-brain barrier in man. In: Bradbury, M.W.B.: Physiology and pharmacology of the blood-brain barrier. Handbook of experimental pharmacology. Bd. 103. Berlin: Springer-Verlag, 1992, S. 525-542
- [70] **H.T. Haigler, F.R. Maxfield, M.C. Willingham und I. Pastan:** Dansylcadaverine inhibits internalization of ¹²⁵I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 255 (1980), Nr. 4, S. 1239-1241
- [71] **H.J. Haisma, E. Boven, M. Vanmuijen, J. Dejong, W.J.F. Vandervijgh und H.M. Pinedo:** A monoclonal antibody-beta-glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin for specific treatment of cancer. In: *British Journal of Cancer* 66 (1992), S. 474-478
- [72] **T. Halmos, M. Santarromana, K. Antonakis und D. Scherman:** Synthesis of glucose-chlorambucil derivatives and their recognition by the human GLUT1 glucose transporter. In: *European Journal of Pharmacology* 318 (1996), S. 477-484
- [73] **C.B. Hansen, G.Y. Kao, E.H. Moase, S. Zalipsky und T.M. Allen:** Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1239 (1995), S. 133-144
- [74] **R.P. Haugland:** *Handbook of fluorescent probes and research chemicals* 6. Aufl. Eugene: Molecular Probes, 1996
- [75] **Y. Hayashi, M. Nomura, S.-I. Yamagashi, S.-I. Harada, J. Yamashita und H. Yamamoto:** Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. In: *Glia* 19 (1997), S. 13-26
- [76] **J. Head, L.L.Y. Lee, D.J. Field und J.C. Lee:** Equilibrium and rapid kinetic studies on nocodazole-tubulin interaction. In: *The Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), Nr. 20, S. 11060-11066

- [77] **J.L.M. Heeremans, J.J. Kraaijenga, P. Los, C. Kluft und D.J.A. Crommelin:** Development of a procedure for coupling the homing device glu-plasminogen to liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1117 (1992), S. 258-264
- [78] **D.G. Hoare und D.E. Koshland:** A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 242 (1967), S. 2447-2453
- [79] **D. Hoheisel, T. Nitz, H. Franke, J. Wegener, A. Hakvoort, T. Tilling und H.-J. Galla:** Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1998), S. 312-316
- [80] **H. Huai-Yun, D.T. Secrest, K.S. Mark, D. Carney, C. Brandquist, W.F. Elmquist und D.W. Miller:** Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (1998), Nr. 3, S. 816-820
- [81] **A.L. Hubbard:** Endocytosis. In: *Current Opinion in Cell Biology* 117 (1989), S. 131-177
- [82] **R.D. Hurst und I.B. Fritz:** Properties of an immortalized vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. In: *Journal of Cell Physiology* 167 (1996), S. 81-88
- [83] **J. Huwyler und W.M. Pardridge:** Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: Pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 (1997), Nr. 3, S. 1541-1546
- [84] **J. Huwyler und W.M. Pardridge:** Examination of blood-brain barrier transferrin receptor by confocal fluorescent microscopy of unfixed isolated rat brain capillaries. In: *Journal of Neurochemistry* 70 (1998), Nr. 2, S. 883-886
- [85] **J. Huwyler, J. Drewe, C. Klusemann und G. Fricker:** Evidence for p-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. In: *British Journal of Pharmacology* 118 (1996), S. 1879-1885
- [86] **J. Huwyler, D. Wu und W.M. Pardridge:** Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93 (1996)
- [87] **J. Huwyler, J. Drewe, H. Gutmann, M. Thöle und G. Fricker:** Modulation of morphine-6-glucuronide penetration into the brain by P-glycoprotein. In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36 (1998), Nr. 2, S. 69-70
- [88] **E.A. Jaffe, L.W. Hoyer und R.L. Nachman:** Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. In: *Proceedings of the National Academy USA* 85 (1974), S. 1906-1909
- [89] **F. Joó:** The cerebral microvessels in culture, an update. In: *Journal of Neurochemistry* 58 (1992), S. 1-17
- [90] **Y.-S. Kang und W.M. Pardridge:** Brain delivery of biotin bound to a conjugate of neutral avidin and cationized human albumin. In: *Pharmaceutical Research* 11 (1994), Nr. 9, S. 1257-1264
- [91] **Y.S. Kang, T. Terasaki und A. Tsuji:** Acidic drug transport in vivo through the blood-brain barrier. A role of the transport carrier for monocarboxylic acids. In: *Journal of Pharmacobiodynamics* 13 (1990), Nr. 2, S. 158-163
- [92] **J. Karlsson und P. Artursson:** A new diffusion chamber system for the determination of drug permeability coefficients across the human intestinal epithelium that are independent of the unstirred water layer. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1111 (1992), S. 204-210
- [93] **A.L. Kiss und H.J. Geuze:** Caveolae can be alternative endocytic structures in elicited macrophages. In: *European Journal of Cell Biology* 73 (1997), Nr. 5, S. 19-27
- [94] **J.T. Kley, T. Fichert und U. Massing:** Synthesis of novel thiol-reactive amphiphilic lipids based on cholesterol for protein-liposome coupling. In: *Monatshefte für Chemie* 129 (1998), S. 319-327
- [95] **V.P. Knutson, G.V. Ronnett und M.D. Lane:** Rapid, reversible internalization of cell surface insulin receptors. In: *The Journal of Biological Chemistry* 258 (1983), Nr. 20, S. 12139-12142
- [96] **K. Kobayashi, M. Han, S. Watarai und T. Yasuda:** Availability of liposomes as drug carriers to the brain. In: *Acta Med. Okayama* 50 (1996), Nr. 2, S. 67-72
- [97] **D. Krause, U. Mischek, H.J. Galla und R. Dermietzel:** Correlation of zonula occludens ZO-1 antigen expression and transendothelial resistance in porcine and rat cultured cerebral endothelial cells. In: *Neuroscience Letters* 128 (1991), S. 301-304

- [98] **J. Kreuter:** Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. In: *Journal of Anatomy* 189 (1996), S. 503-505
- [99] **J. Kreuter, R.N. Alyautin, D.A. Kharkevich und A.A. Ivanov:** Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles. In: *Brain Research* 674 (1995), S. 171-174
- [100] **R. Krotz:** *Wirkstoffeigenschaften als Faktoren der Beladung und Freigabe aus Liposomen* Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1992
- [101] **M. Kuhn:** *Quantitative in vitro-Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Zellen mit Hilfe fluorimetrischer Methoden* Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1994
- [102] **A.K. Kumagai und J.B., Pardridge, W.M. Eisenberg:** Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a β -endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. In: *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), S. 15214-15219
- [103] **B. Kummer-Femgen:** *Identifizierung der 5 β -Cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol und Salze langkettiger Fettsäuren bindenden Proteine der Endothelzellen des Schweinehirns* Dissertation, Universität Freiburg, 1993
- [104] **U.K. Laemmli:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680-685
- [105] **F. Lasbennes und J. Gayet:** Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. In: *Neurochemical Research* 9 (1984), S. 1-10
- [106] **D. Lasic und F. Martin:** *Stealth liposomes* Boca Raton: CRC Press, 1995
- [107] **D. Lechardeur, B. Schwartz, D. Paulin und D. Scherman:** Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain derived endothelial cell line. In: *Experimental Cell Research* 220 (1995), S. 161-170
- [108] **D. Lechardeur, B. Schwartz und D. Scherman:** Rat brain microvessel endothelial cells: primary cultures and immortalized differentiated cell line. In: deBoer, A.G. und Sutanto, W.: *Drug transport across the blood-brain barrier: new experimental strategies*. Amsterdam: Harwood Scientific Publisher, 1997
- [109] **F.D. Ledley:** Non-viral gene therapy. In: *Current Opinion in Biotechnology* 5 (1994), S. 626-636
- [110] **J.C. Lee, D.J. Field und L.L.Y. Lee:** Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. In: *Biochemistry* 19 (1980), S. 6209-6215
- [111] **R.J. Lee und P.S. Low:** Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 3198-3204
- [112] **L.E. Lilien, M. Sendtner, H. Rohrer, S.M. Hughes und M.C. Raff:** Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. In: *Neuron* 1 (1988), S. 485-494
- [113] **R. Löbenberg, L. Araujo, H. von Briesen, E. Rodgers und J. Kreuter:** Body distribution of azidothymidin bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i. v. injection to rats. In: *Journal of Controlled Release* 50 (1998), S. 21-30
- [114] **H. Loughrey, M.B. Bally und P.R. Cullis:** A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 901 (1987), Nr. 1, S. 157-160
- [115] **H.C. Loughrey, L.S. Choi, P.R. Cullis und M.B. Bally:** Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes. In: *Journal of Immunological Methods* 132 (1990), S. 25-35
- [116] **M. Lück:** *Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulären Trägern* Dissertation, Freie Universität Berlin, 1997
- [117] **E. Majima, S. Goto, H. Hori, Y. Shinohara, Y.-M. Hong und H. Terada:** Stabilities of the fluorescent SH-reagent eosin-5-maleimide and its adducts with sulfhydryl compounds. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1243 (1995), S. 336-342
- [118] **F.J. Martin und D. Papahadjopoulos:** Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. In: *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr. 1, S. 286-288

- [119] **F.J. Martin, L.H. Wayne und D. Papahadjopoulos:** Immunospecific targeting of liposomes to cells: a novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds. In: *Biochemistry* 20 (1981), S. 4229-4238
- [120] **K. Maruyama, N. Takahashi, T. Tagawa, K. Nagaike und M. Iwatsuru:** Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vitro. In: *FEBS Letters* 413 (1997), S. 177-180
- [121] **L.D. Mayer, M.B. Bally, M.J. Hope und P.R. Cullis:** Uptake of antineoplastic agents into large unilamellar vesicles in response to a membrane potential. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 816 (1985), S. 294-302
- [122] **L.D. Mayer, M.B. Bally und P.R. Cullis:** Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 857 (1986), S. 123-126
- [123] **L.D. Mayer, M.B. Bally, M.J. Hope und P.R. Cullis:** Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 40 (1986), S. 333-345
- [124] **E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Y.M. Rustum und C. Dave:** Inhibition of tumor cell growth in vitro and in vivo by 1- β -D-arabinofuranosylcytosine entrapped with phospholipid vesicles. In: *Cancer research* 36 (1976), S. 4406-4411
- [125] **R.G. Melton:** Preparation and purification of antibody-enzyme conjugates for therapeutic applications. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 (1996), S. 289-301
- [126] **E. Mentrup:** *Validierung der Herstellung und Depoteffekt wirkstoffhaltiger Liposomen* Heidelberg: Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1988
- [127] **M. Mercadal, J.C. Domingo, J. Petriz, J. Garcia und M.A. de Madaraga:** A novel strategy affords high-yield coupling of antibody to extremities of liposomal surface-grafted PEG chains. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1999 (1999), S. 232-238
- [128] **M.J. Micklus, N.H. Greig, J. Tung und S.I. Rapoport:** Organ distribution of liposomal formulations following intracarotid infusion in rats. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1124 (1992), S. 7-12
- [129] **T. Minagawa, K. Sakanaka, S.-I. Inaba, Y. sai, I. Tamai, T. Suwa und A. Tsuji:** Blood-brain-barrier transport of lipid microspheres containing clinprost, a prostaglandin I₂ analogue. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48 (1996), S. 1016-1022
- [130] **T. Minakawa, J. Bready, J. Berliner, M. Fisher und P.A. Cancilla:** In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. In: *Laboratory Investigation* 65 (1991), Nr. 1, S. 32-40
- [131] **U. Mischek, J. Meyer und H.-J. Galla:** Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. In: *Cell Tissue Research* 256 (1989), S. 221-226
- [132] **H. Mizuguchi, Y. Hashioka, A. Fujii, N. Utogochi, K. Kubo, S. Nakagawa, A. Baba und T. Mayumi:** Glial extracellular matrix modulates γ -glutamyl transpeptidase activity in cultured bovine brain capillary and bovine aortic endothelial cells. In: *Brain Research* 651 (1994), S. 155-159
- [133] **A. Mori, A.L. Klibanov, V.P. Torchilin und L. Huang:** Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethylene-glycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. In: *FEBS Letters* 284 (1991), Nr. 2, S. 263-266
- [134] **S.A. Morris, S. Ahle und E. Ungewickell:** Clathrin-coated vesicles. In: *Current Opinion in Cell Biology* 1 (1989), S. 675-683
- [135] **K.E. Mostov und N.E. Simister:** Transcytosis. In: *Cell* 43 (1985), S. 389-390
- [136] **B.B. Mrsulja, B.J. Mrsulja, T. Fujimoto, I. Klatzo und M. Spatz:** Isolation of brain capillaries: a simplified technique. In: *Brain Research* 110 (1976), S. 361-365
- [137] **S. Mukherjee, R.N. Ghosh und F.R. Maxfield:** Endocytosis. In: *Physiological Reviews* 77 (1997), Nr. 3, S. 759-803
- [138] **A. Muruganandam, L. Moorhouse Herx, R. Monette, J.P. Durkin und D.B. Stanimirovic:** Development of an immortalized human cerebrovascular cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. In: *The FASEB Journal* 11 (1997), S. 1187-1197

- [139] **R.R.C. New:** Liposomes: a practical approach. In: Rickwood, D. und Hames, B.D.: The practical approach series. Oxford: IRL Press, 1990
- [140] **M. Noble und K. Murray:** Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential progenitor cell. In: *The EMBO Journal* 3 (1984), Nr. 10, S. 2243-2247
- [141] **W.H. Oldendorf:** Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. In: *Brain Research* 24 (1970), S. 372
- [142] **W.H. Oldendorf:** Carrier mediated blood-brain barrier transport of short chain monocarboxylic organic acids. In: *American Journal of Physiology* 224 (1973), S. 1450
- [143] **W.H. Oldendorf:** Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 147 (1974), S. 813-816
- [144] **W.H. Oldendorf:** Blood brain barrier permeability to drugs. In: *Annual Reviews Pharmacology* 14 (1974), S. 239-348
- [145] **M. Orlowski und A. Meister:** γ -Glutamyl-p-nitroanilid: A new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 73 (1963), S. 679-681
- [146] **M. Orlowski, G. Sessa und J.P. Green:** γ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. In: *Science* 184 (1974), S. 66-68
- [147] **R.E. Pagano, A.J. Schroit und D.K. Struck:** Interactions of phospholipid vesicles with mammalian cells in vitro. In: Knight, C.G.: Liposomes: from physical structure to therapeutic applications. Amsterdam: North Holland Biomedical Press / Elsevier, 1981
- [148] **P. Panula, F. Joó und L. Rechardt:** Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. In: *Experientia* 34 (1978), S. 95-97
- [149] **W.M. Pardridge:** Regulation of amino acid availability to brain: selective control mechanisms for glutamate. In: Filer, L.J., Jr., et al.: Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology. New York: Raven Press, 1979, S. 125-137
- [150] **W.M. Pardridge:** New directions in blood-brain barrier research. In: *Annals New York Academy of Sciences* 529 (1988), S. 50-60
- [151] **W.M. Pardridge:** *Peptide drug delivery to the brain* New York: Raven Press, 1991, S. 239-279
- [152] **W.M. Pardridge:** Drug transport through the blood-brain barrier using liposome/antibody conjugates. (1995)
- [153] **W.M. Pardridge:** Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 15 (1995), S. 5-36
- [154] **W.M. Pardridge:** Vector-mediated peptide drug delivery to the brain. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 15 (1995), S. 109-146
- [155] **W.M. Pardridge:** Brain drug delivery and blood-brain barrier transport. In: *Drug Delivery* 3 (1996), S. 99-115
- [156] **W.M. Pardridge und W.H. Oldendorf:** Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 401 (1975), S. 128-136
- [157] **W.M. Pardridge, J. Eisenberg und T. Yamada:** Rapid sequestration and degradation of somatostatin analogues by isolated brain microvessels. In: *Journal of Neurochemistry* 44 (1985), Nr. 4, S. 1178-1184
- [158] **W.M. Pardridge, D. Triguero und J. Buciak:** Transport of histone through the blood brain barrier. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251 (1989), Nr. 3, S. 821-824
- [159] **W.M. Pardridge, D. Triguero, J. Buciak und J. Yang:** Evaluation of cationized rat albumin as a blood-brain barrier drug transport vector. In: *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 255 (1990), Nr. 2, S. 893-899
- [160] **W.M. Pardridge, R.J. Boado und C.R. Farrell:** Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. In: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), S. 18035-18040

- [161] **W.M. Pardridge, Y.-S. Kang, J.L. Buciak und J. Yang:** Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. In: *Pharmaceutical Research* 12 (1995), Nr. 6, S. 807-816
- [162] **R. Perez-Soler, K. Francis, S. al-Baker, F. Pilkiewicz und A.R. Khokar:** Preparation and characterization of liposomes containing a lipophilic cisplatin derivative for clinical use. In: *Journal of Microencapsulation* 11 (1994), S. 41-54
- [163] **G.L. Peterson:** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. In: *Analytical Biochemistry* 83 (1977), S. 346-356
- [164] **G.L. Peterson:** Review of folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. In: *Analytical Biochemistry* 100 (1979), S. 201-220
- [165] **L. Pillus und F. Solomon:** Components of microtubular structures in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83 (1986), S. 2468-2472
- [166] **S. Raessi und K.L. Audus:** In-vitro characterization of blood-brain barrier permeability to delta sleep-inducing peptide. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41 (1989), S. 848-852
- [167] **M.H. Rahimy, J.W. Simpkins und N. Bodor:** Dose and time-course evaluation of a redox-based estradiol-chemical delivery system for the brain. II. Pharmacodynamic responses. In: *Pharmaceutical Research* 7 (1990), Nr. 11, S. 1107-1112
- [168] **E. Ralston, L.M. Hjemelund, R.D., Weinstein, J.N. Klausner und R. Blumenthal:** Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions. Effect of impurities and purification of dye. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 649 (1981), S. 133-137
- [169] **T.J. Raub, G.A. Kuentzel und S.L. Sawada:** Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. In: *Experimental Cell Research* 199 (1992), S. 330-340
- [170] **A. Regina, A. Koman, M. Piciotti, B. El Hafny, M.S. Center, R. Bergmann, P.-O. Couraud und F. Roux:** Mrp 1 multidrug resistance associated protein and p-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. In: *Journal of Neurochemistry* 71 (1998), S. 705-713
- [171] **F. Roux, O. Durieu-Trautman, M. Chaverot, M. Claire, P. Mailly, J.F. Bourre, A.D. Strosberg und P.O. Couraud:** Regulation of gamma-glutamyltranspeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalised rat brain microvessel endothelial cells. In: *Journal of Cell Physiology* 159 (1994), S. 101-113
- [172] **L.L. Rubin:** Endothelial cells: adhesion and tight junctions. In: *Current Opinion in Cell Biology* (1992), Nr. 4, S. 830-833
- [173] **L.L. Rubin, D.E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H.C. Horner, M. Janatpour, C.W. Liaw, K. Manning, J. Morales, L.I. Tanner, Tomaselli K.J. und F. Bard:** A cell culture model of the blood-brain barrier. In: *The Journal of Cell Biology* 115 (1991), Nr. 6, S. 1725-1735
- [174] **G. Schackert, D. Fan, R. Nayar und I.J. Fidler:** Arrest and retention of multilamellar liposomes in the brain of normal mice bearing experimental brain metastases. In: *Selective Cancer Therapeutics* 5 (1989), S. 73-79
- [175] **G.L. Scherphof, J. Dijkstra, H.H. Spanjer, J.T.P. Derksen und F.H. Roerdink:** Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat kupffer cells in vivo and in vitro. In: *Annals New York Academy of Sciences* (1985), Nr. 446, S. 368-384
- [176] **J.E. Schnitzer, P. Oh, E. Pinney und J. Allard:** Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules. In: *The Journal of Cell Biology* 127 (1994), Nr. 5, S. 1217-1232
- [177] **R.A. Schwendener, T. Trüb, H. Schott, H. Langhals, R.F. Barth, P. Groscurth und H. Hengartner:** Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctional coupling agents and investigation of in vitro immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1026 (1990), S. 69-79
- [178] **S. Seetharaman, M.A. Barrand, L. Maskell und R.J. Scheper:** Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from this isolates. In: *Journal of Neurochemistry* 70 (1998), Nr. 3, S. 1151-1159

- [179] **G. Sessa und G. Weissmann:** Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. In: *Journal of Lipid Research* 9 (1968), S. 310-318
- [180] **S. Shahinian und J.R. Silvius:** A novel strategy affords high-yield coupling of antibody Fab' fragments to liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1239 (1995), S. 157-167
- [181] **A. Sharma, E. Mayhew und R.M. Straubinger:** Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murin tumor model. In: *Cancer Research* 53 (1993), S. 5877-5881
- [182] **K.R. Smith und R.T. Borchardt:** Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. In: *Pharmaceutical Research* 6 (1989), Nr. 6, S. 466-473
- [183] **M.R. Soria, Loughrey H., A. Ferraretto, A.-M. Cannon, G. Acerbis, F. Sudati, G. Bottiroli und M. Masserini:** Targeting applications of biotinylated liposomes. In: *Journal of Liposome Research* 3 (1993), Nr. 3, S. 543-549
- [184] **R. Spector und C.E. Johanson:** The mammalian choroid plexus. In: *Scientific American* (1989), Nr. 11, S. 68-74
- [185] **R.M. Straubinger, D. Papahadjopoulos und K. Hong:** Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 4929-4939
- [186] Schutzrecht EP 0607978A1 (1994-01-20). Mitsubishi Kasei Corp.
- [187] **Y. Takakura, K.L. Audus und R.T. Borchardt:** Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. In: *Advances in Pharmacology* 22 (1991), S. 137-165
- [188] **Y. Takasato, S.I. Rapoport und W.R. Smith:** An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. In: *American Journal of Physiology* 247 (1984), S. H484-H493
- [189] **I. Tamai und A. Tsuji:** Drug delivery through the blood-brain barrier. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 19 (1996), S. 401-424
- [190] **T. Terasaki, Ken-Ichirai, H. Sato, Y.S. Kang und A. Tsuji:** Absorptive mediated endocytosis of a dynorphin-like analgesic peptide, E2078, into the blood-brain barrier. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251 (1989), Nr. 1, S. 351-357
- [191] **T. Terasaki, Y. Deguchi, H. Sato, K. Hirai und A. Tsuji:** In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E-2078, through the blood-brain barrier: an application of brain microdialysis. In: *Pharmaceutical Research* 8 (1991), S. 815-820
- [192] **T. Terasaki, S. Takakuwa, S. Moritani und A. Tsuji:** Transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier: studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 258 (1991), Nr. 3, S. 932-937
- [193] **T.H. The und T.E.W. Feltkamp:** Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. In: *Immunology* 18 (1970), S. 865
- [194] **G. Thews, G. Mutschler und P. Vaupel:** *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen* 4. Aufl. Stuttgart: WVG, 1991, S. 33
- [195] **H. Tokuda, S. Masuda, Y. Takakura, H. Sezaki und M. Hashida:** Specific uptake of succinylated proteins via a scavenger receptor-mediated mechanism in cultured brain microvessel endothelial cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196 (1993), Nr. 1, S. 18-24
- [196] **M. Török:** *Permeability and transport of clonidine and benzylpenicillin across the blood-brain barrier* Diplomarbeit Universität Basel, 1996
- [197] **D. Triguero, J. Buciak und W.M. Pardridge:** Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. In: *Journal of Neurochemistry* 54 (1990), Nr. 6, S. 1882-1888
- [198] **A. Unterberg, M. Wahl und A. Baethmann:** Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 4 (1984), S. 574-585
- [199] **D.L. Urdal und S. Hakomori:** Tumor-associated ganglio-N-triosylceramide: target for antibody-dependent, avidin-mediated drug killing of tumor cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 255 (1980), S. 10509-10515

- [200] **H.H. Ussing und K. Zerahn:** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. In: *Acta Physiologica Scandinavia* 23 (1951), S. 110-127
- [201] **J.B.M.M. van Bree, A.G. de Boer, M. Danhof, L.A. Ginsel und D.D. Breimer:** Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 247 (1988), Nr. 3, S. 1233-1239
- [202] **B. van Deurs, P.K. Holm, K. Sandvig und S.H. Hansen:** Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis?. In: *Trends in Cell Biology* 3 (1993), S. 249-251
- [203] **W. van Gelder, M.I. Cleton-Soeteman, M.I.E. Huijskes-Heins, P. R.W.A. van Run und H.G. van Eijk:** Transcytosis of 6.6 nm gold-labeled transferrin: an ultrastructural study in cultured porcine blood brain barrier endothelial cells. In: *Brain Research* 746 (1997), S. 105-116
- [204] **B. Veronesi:** Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. In: *Neurotoxicology* 17 (1996), Nr. 2, S. 433-444
- [205] **H.S. Wiley und D.D. Cunningham:** The endocytic rate constant. In: *The Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr. 8, S. 4222-4229
- [206] **S.K. Williams, J.F. Gillis, M.A. Matthews, R.C. Wagner und M.W. Bitensky:** Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity. In: *Journal of Neurochemistry* 35 (1980), Nr. 2, S. 374-381
- [207] **M.C. Woodle, K.K. Matthey, M.S. Newman, J.E. Hidayat, L.R. Collins, C. Redemann, F.J. Martin und D. Papahadjopoulos:** Versatility in lipid composition showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1105 (1992), S. 193-200
- [208] **D. Wu, R.J. Boado und W.M. Pardridge:** Pharmacokinetics and blood-brain barrier transport of [³H]-biotinylated phosphorothioate oligodeoxynucleotide conjugated to a vector-mediated drug delivery system. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 276 (1996), Nr. 1, S. 206-211
- [209] **N.Z. Wu, D. Da, T.L. Rudoll, D. Needham, A.R. Whorton und M.W. Dewhirst:** Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissues. In: *Cancer Research* 53 (1993), S. 3765-3770
- [210] **H. Yu und P.J. Sinko:** Influence of the microporose substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: Calculation of intrinsic transport parameters. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (1997), Nr. 12, S. 1448-1457
- [211] **S. Zalipsky:** Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. In: *Bioconjugate Chemistry* 4 (1993), Nr. 4, S. 296-299
- [212] **B.V. Zlokovic:** In vivo approaches for studying peptide interactions at the Blood-Brain Barrier. In: *Journal of Controlled Release* 13 (1990), S. 185-201
- [213] **B.V. Zlokovic, D.J. Begley, B.M. Djuricic und D. Mitrovic:** Measurement of solute transport across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain: method and application to N-methyl- α -aminobutyric acid. In: *Journal of Neurochemistry* 46 (1986), S. 1444-1451